

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevas estrategias proteómicas para el estudio de la evolución de  
albuminuria en pacientes con hipertensión arterial**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Montserrat Baldán Martín**

Directora

M<sup>a</sup> Eugenia González Barderas

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**Nuevas estrategias proteómicas para el  
estudio de la evolución de albuminuria en  
pacientes con hipertensión arterial**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Montserrat Baldán Martín**

Bajo la dirección de la doctora  
M<sup>a</sup> Eugenia González Barderas

**Madrid, 2017**





Dña. M<sup>a</sup> Eugenia González Barderas, Dra. en Bioquímica y Biología Molecular, por la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Laboratorio de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Paraplégicos

**CERTIFICA:**

Que, Dña. Montserrat Baldan Martín Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Nuevas estrategias proteómicas para el estudio de la evolución de la albuminuria en pacientes con hipertensión arterial”, que presenta como Tesis Doctoral para obtener el grado de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid.

Revisado el presente trabajo, estima que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos, además de haberse evaluado por otros expertos, lo que dio lugar a su publicación en reconocidas revistas internacionales. Por ello, da su conformidad a su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firma el presente en Toledo, a      de Febrero de 2017.

Directora:

Doctorando:

Dra. M<sup>a</sup> Eugenia González Barderas

Montserrat Baldán Martín





A mis padres

A mis hermanos y sobrinas

A mis tíos y primos

A mis abuelos

A Pablo



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido de una manera u otra en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar y de manera muy especial quiero agradecer todo este trabajo a mi directora de tesis. Gracias Maru por haberme dado la oportunidad de crecer a nivel profesional y por toda la confianza que tuviste en mí desde el primer momento. Gracias por tu paciencia, comprensión e inestimable ayuda que me has dado durante estos años. Gracias por tus sabios consejos y por todo el cariño que siempre he recibido.

Quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio. A Tamara, gracias por lo que me has ayudado durante este tiempo, por estar siempre dispuesta con una sonrisa y por los buenos ratos que hemos pasado en las comidas desde que te empezaste a quedar con nosotras. A Laura, por tu ayuda y amistad que siempre me diste desde el primer minuto, por escucharme y animarme siempre que lo he necesitado y gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas y los muchos que nos quedan por vivir. Nerea, gracias por ayudarme con las muestras y continuar con todos los análisis que quedaron pendientes, espero que podamos seguir trabajando juntas mucho tiempo. Tati y Raúl, gracias también a vosotros porque, aunque hemos pasado pocos momentos juntos, siempre habéis tenido unas palabras de ánimo y cariño cuando me ha hecho falta (espero poder irlos conociendo ahora más). También me gustaría agradecer a los que ya no están en el labo. Gracias Rafa por todo lo que me has enseñado de Biología Celular y en especial y con todo mi cariño a Fer, porque desde el primer momento que empecé me llevaste de la mano y me enseñaste de la mejor forma que podías hacerlo. Gracias por todo lo que he aprendido de ti y lo mucho que me has valorado siempre. A Luis R. Padial, porque gracias a su ayuda se ha conseguido la financiación que me ha permitido desarrollar este trabajo durante estos 4 años.

Además, agradezco a todos los Laboratorios colaboradores por la ayuda prestada para la realización de esta Tesis. Gracias al Laboratorio de Inmunología de la ISS Fundación Jiménez Díaz. A Fernando Vivanco, por su ayuda tanto con el máster como en la tesis. A Gloria por toda la ayuda recibida durante la realización del proyecto. A Laura, por los buenos ratos que hemos pasado en los congresos y por sentirme comprendida en la

clasificación de pacientes y análisis de resultados. A Marta, por tu sonrisa y simpatía. A Paula, que durante este último año que nos hemos conocido, ha sido un placer tenerte en el laboratorio y, mejor aún, de compañera de viaje. Gracias al Laboratorio de Proteómica del CNIC, a Jesús Vázquez, a Fernando por todos sus conocimientos informáticos y por su ayuda en los análisis de datos y de manera muy especial a Juan Antonio. Gracias por lo mucho que me has ayudado con los experimentos y no experimentos, por los buenísimos momentos que hemos pasado juntos mientras trabajábamos y por tu amistad, gracias de corazón. A la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre. A Gema, Lucía y Julián por toda la gestión y coordinación de este proyecto. En especial quiero agradecer a Luis Miguel Ruilope por su ayuda recibida durante todo este tiempo, tanto con cuestiones clínicas como en los artículos, estancia y en todo lo que fuera posible. Gracias a todos los pacientes hipertensos que han formado parte de este estudio. Gracias a los Servicios del Hospital Nacional de Paraplégicos que han participado en este trabajo y al Laboratorio de Análisis Clínicos dirigido por Carlos Martínez Laborde por todos los ensayos realizados. También quiero agradecer al Laboratorio de Bases clínicas y experimentales de la patología cardiovascular, a Massimo Volpe y Speranza Rubattu por haberme abierto las puertas de su laboratorio donde he aprendido muchísimo y he pasado el último periodo de mi Tesis Doctoral.

También quiero agradecer todo el cariño recibido de mis amigos. A mis amigos de la universidad (Mariana, Patricia, Juan, Arancha, Rober, Fahima, Jahime, Jorge, Nuñez, Diego...) con los que he compartido siempre momentos de risas y alegrías y que, por mucho que pase el tiempo siempre sacamos un ratito para juntarnos y ponernos al día con nuestras vidas. A mis chicas decathlonianas (Sari, Sandri, Lorennny, Ali y Angy), por estar siempre pendiente y sentirnos cerca mía a pesar de la distancia. A Sara por todos estos años de amistad, cariño y maravillosas experiencias que hemos pasado juntas. A Irene, gracias por formar parte de mi vida y por apoyarme durante todo este tiempo, que suerte tengo de haberte conocido.

En especial quiero dar las gracias a toda mi familia, mi mayor tesoro y a la que me hace tan afortunada formar parte de ella. A mis abuelos, por todo el amor que me dais en el día a día, sé que estaréis orgullosos y contentos de que haya llegado hasta aquí. A mis tíos, primos y primitos, por todas las cosas buenas que me aportáis en la vida y porque teneros cerca es el mejor regalo que puedo tener. A Eva, gracias por entrar en la familia

y formar parte de ella. A mi hermano Raúl, la persona más luchadora que he conocido, un ejemplo a seguir, gracias por haberme dado a las dos sobrinas más bonitas del mundo. A mi hermana Angela, gracias por ser mi confidente, mi mano derecha y por quererme tanto. Eres mi mitad. A mis padres, Raul y Montse, el pilar fundamental de mi vida, no sé cómo agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí. Gracias por vuestro amor incondicional, cariño, esfuerzo y por haberme guiado por el buen camino. Os debo todo.

Por último, quiero dar las gracias a Pablo. Gracias por tu amor, paciencia y comprensión. Gracias por ser mi apoyo en todo, por mimarme y aguantarme durante todo este tiempo, que no ha sido fácil. Gracias por todo lo que has hecho por mí, por valorarme tanto y por estar siempre a mi lado. Espero poder compensarte.

Gracias a todos.



# Índice





<b>RESUMEN</b> .....	<b>17</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>21</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>31</b>
1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR .....	33
1.1. CONTINUUM CARDIORRENAL .....	35
2. HIPERTENSIÓN ARTERIAL .....	36
2.1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA .....	38
2.2. ALBUMINURIA .....	40
3. PROTEÓMICA .....	42
3.1 MÉTODOS EMPLEADOS EN PROTEÓMICA .....	43
3.2. ABORDAJE MULTI-PROTEÓMICO DESARROLLADO EN ESTA TESIS DOCTORAL .....	44
3.3. PROTEÓMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA HIPERTENSIÓN Y DAÑO RENAL .....	46
4. EL PLASMA Y LAS VESICULAS EXTRACELULARES DEL PLASMA .....	48
5. MODELOS IN VITRO .....	51
Ensayo in vitro para el estudio de la disfunción endotelial .....	51
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>53</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>57</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
1. SELECCIÓN DE PACIENTES .....	64
2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	66
2.1. PLASMA .....	67
2.2. AISLAMIENTO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DEL PLASMA .....	67

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MORFOLÓGICA DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	67
3.1. EVALUACIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE EN LAS VEs POR CITOMETRÍA DE FLUJO .....	68
3.2. VISUALIZACIÓN DE LAS VEs DE ORIGEN PLAQUETARIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL .....	69
3.3. VISUALIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS VEs MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	69
4. ABORDAJE MULTI-PROTEÓMICO APLICADO AL ESTUDIO DE LA ALBUMINURIA EN PACIENTES HIPERTENSOS CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA.....	71
4.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DEL PLASMA.....	72
4.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DIFERENCIAL EN GEL (2D-DIGE) .....	74
4.3. iTRAQ .....	80
4.4. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y BÚSQUEDAS EN BASES DE DATOS .....	83
4.5. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	86
4.6. BIOLOGÍA DE SISTEMAS .....	88
5. ENSAYO IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE DOS NUEVOS MARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES HIPERTENSOS CON ALBUMINURIA.....	89
5.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES.....	89
5.2. EXPANSIÓN DE LAS CE <sub>s</sub> .....	91
5.3. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO ENDOTELIAL .....	92
5.4. ACTIVACIÓN DE CE <sub>s</sub> MEDIANTE EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL .....	94
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	98
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>100</b>
1. ABORDAJE MULTI-PROTEÓMICO EN PLASMA DE PACIENTES HIPERTENSOS BAJO SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA CON DISTINTO GRADO DE AFECTACIÓN RENAL .....	102

1.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL MEDIANTE 2D-DIGE .....	103
1.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL MEDIANTE iTRAQ.....	106
1.3. CONFIRMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALES MEDIANTE SRM.....	113
1.4. CONFIRMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALES MEDIANTE TURBIDIMETRÍA.....	118
1.5. ESTUDIO PROSPECTIVO EN PLASMA DE PACIENTES NORMOALBUMINÚRICOS .....	121
2. ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN VEs DEL PLASMA DE PACIENTES HIPERTENSOS BAJO SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA CON DISTINTO GRADO DE DAÑO RENAL.....	122
2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS VESICULAS EXTRACELULARES .....	122
2.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL MEDIANTE iTRAQ.....	124
2.3. CONFIRMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALES MEDIANTE SRM.....	128
3. ANÁLISIS IN VITRO DE LA EXPRESIÓN DE KALIRINA Y CHD7 EN CE <sub>s</sub> TRATADAS CON TNF- $\alpha$ .....	130
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO ENDOTELIAL .....	130
3.2. EXPRESIÓN DE KALIRINA Y CHD7 EN CE <sub>s</sub> ACTIVADAS .....	131
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>134</b>
1. ABORDAJE MULTI-PROTEÓMICO EN PLASMA DE PACIENTES HIPERTENSOS CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA.....	137
Perfil proteómico asociado al desarrollo de albuminuria .....	138
Perfil proteómico asociado al daño orgánico crónico .....	139
Proteínas predictoras del desarrollo de albuminuria y marcadoras de daño renal.....	141
2. ABORDAJES PROTEÓMICOS EN LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DEL PLASMA DE PACIENTES HIPERTENSOS CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA.....	145
3. INTEGRACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....	149
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>152</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>160</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>

# Resumen



Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la primera causa de muerte a nivel mundial, siendo la hipertensión arterial (HTA) el principal factor de riesgo asociado a ellas. El Sistema Renina-Angiotensina (SRA) es un sistema hormonal que desempeña un papel fundamental en el control de la presión arterial (PA). Dado que es un mediador clave en la progresión del daño renal y cardiovascular (CV), el uso de fármacos que inhiben el SRA se considera la mejor terapia para el manejo de la HTA. Sin embargo, en un número no despreciable de individuos la progresión hacia ECV y renal sigue avanzando a pesar de estar tratados crónicamente con inhibidores del SRA, lo que indica un cierto grado de ineficacia y respuesta incompleta del tratamiento. El incremento de la excreción de albúmina en orina (albuminuria), a consecuencia de la PA, se considera un marcador de disfunción vascular generalizada y predictor del desarrollo de futuras complicaciones CV y renales. Por ello, la detección temprana de la albuminuria, así como un mejor conocimiento de los mecanismos que puedan estar relacionados con el daño renal subyacente, tendrá un efecto importante en la prevención y progresión de esta patología.

En este trabajo hemos llevado a cabo un abordaje multi-proteómico tanto en plasma como en vesículas extracelulares (VEs) circulantes del plasma de individuos hipertensos con supresión del SRA y distinto grado de afectación renal con el objetivo de identificar los perfiles proteómicos de estos individuos, así como también, la búsqueda de potenciales marcadores pronósticos asociados al desarrollo de la albuminuria. Además, se ha realizado un estudio prospectivo de dos años en el que se identificaron proteínas en plasma con valor predictor de la progresión a albuminuria. Por otro lado, el análisis de las VEs del plasma ha permitido identificar proteínas con potencial valor como marcadores de disfunción endotelial en pacientes con albuminuria, lo que supondría una excelente estrategia para monitorizar la condición vascular en estos individuos.

Una cohorte de 129 pacientes hipertensos clasificados en tres grupos atendiendo a la evolución de albuminuria (normoalbuminuria, albuminuria *de novo* y albuminuria mantenida en el tiempo) fueron incluidos en este estudio. En una primera fase de descubrimiento mediante las técnicas de electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE) y marcaje isobárico diferencial (iTRAQ) en plasma se identificaron 48 proteínas diferenciales entre los distintos grupos de estudio. Posteriormente, se confirmaron algunas de estas proteínas en una cohorte independiente de pacientes mediante la técnica de monitorización por reacción seleccionada (SRM) y turbidimetría. Por otra parte, el análisis de las VEs circulantes del plasma mediante iTRAQ y



confirmación por la técnica SRM permitió identificar a las proteínas Kalirina y CDH7 diferencialmente expresadas en los individuos con albuminuria. Posteriormente, se realizó un ensayo *in vitro* con el fin de corroborar el papel de ambas proteínas en la disfunción endotelial que tiene lugar en los vasos sanguíneos.

Tras los análisis diferenciales en plasma se han identificado un panel predictor de desarrollo de albuminuria *de novo* formado por 4 proteínas relacionadas principalmente con la activación del sistema inmune. Además, se identificó un panel de 18 proteínas marcadoras de daño orgánico crónico cuyos niveles se encontraban alterados en pacientes con albuminuria mantenida en el tiempo. Estas variaciones apuntan a una mayor activación de la respuesta inmune, inflamación, apoptosis y estrés oxidativo en estos individuos. Por otro lado, el estudio prospectivo ha permitido identificar a las ORM1 y CP con potencial valor predictor en el desarrollo de la albuminuria, cuyos niveles se encontraban aumentados en pacientes normoalbuminúricos que, tras dos años de seguimiento, presentaban un incremento en los niveles de albuminuria, lo que permitiría identificar individuos que, sin evidencias tempranas de daño renal, van a evolucionar a albuminuria. El empleo de un abordaje multi-proteómico en el estudio de la evolución de la albuminuria ha permitido identificar distintos perfiles proteómicos asociados al desarrollo de la patología lo que permitirá estratificar mejor a estos individuos y tener un conocimiento más amplio de los mecanismos moleculares implicados en el progreso de la enfermedad cardio-renal.

# Summary



## Summary

Cardiovascular diseases (CVD) represent the first cause of death worldwide being arterial hypertension (HTA), the main risk factor associated with them. The Renin-Angiotensin system (RAS) is a hormonal system which plays a major role in controlling blood pressure (BP). Given that RAS is a key mediator in the progression of renal and cardiovascular (CV) damage, the use of medication based on inhibiting RAS is considered the best therapy for the management of HTA. However, in a significant number of individuals, the progression of CVD and renal disease continues to advance probably facilitated by an inappropriate therapeutic response to ACEi or ARB. This fact indicates that there is a certain degree of inefficiency and incomplete response to treatment. The increase in urinary albumin excretion (albuminuria) as a consequence of BP is considered a marker of generalized vascular dysfunction and predictor of future CV and renal complications. Therefore, early detection of albuminuria, as well as a better understanding of the mechanisms relating to the renal damage, will have a considerable effect on preventing the progression of this pathology.

In this work, we have carried out a multi-proteomics approach both in plasma and circulating extracellular vesicles (EVs) from plasma of hypertensive patients with chronic suppression of RAS and different degrees of renal damage. The main goal was to identify proteomic profiles in this subjects as well as the search for potential prognostic indicators associated with the development of albuminuria. In addition, in a prospective study of two years, we identified plasma proteins with a predictive value of albuminuria progression. On the other hand, the analysis of circulating VEs from plasma has allowed identifying marker proteins of endothelial dysfunction in albuminuric patients. The analysis of EVs would be an excellent tool for monitoring vascular condition in these individuals.

A cohort of 129 patients classified into three groups according to the albuminuria evolution (normoalbuminuric, *de novo* albuminuria and maintained albuminuria) was included in this study. In a first discovery phase, we identified 48 differentially plasma proteins between different groups of study by bidimensional differential in gel electrophoresis (2D-DIGE) and isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ). Subsequently, some of these proteins were confirmed in an independent cohort of patients by selected reaction monitoring (SRM) and turbidimetry. Moreover, the extracellular vesicles (EVs) analysis by iTRAQ and SRM has been able to identify

## Summary

Kalirin and CHD7 to be increased in EVs from albuminuric patients. *In vitro* analysis showed and proved their involvement in endothelial cell (EC) activation within blood vessels. Thus, we propose protein levels of kalirin and CHD7 in circulating EVs as novel endothelial dysfunction markers in hypertensive patients with albuminuria.

Our data show the existence of 2 characteristic plasma protein signatures described for the first time consisting of: 1) protein candidates to be markers of *de novo* albuminuria, composed by 4 proteins related to immune response and 2) sustained albuminuria indicator proteins, made up of 18 proteins, which may be considered markers of end organ damage related to activation of the immune response, inflammation, apoptosis and oxidative stress. Furthermore, we performed a prospective study of the evolution of normoalbuminuric patients after two years follow-up, classifying them into two groups based on the change of urinary albumin levels: a) patients who progressed to higher albumin levels and b) patients with no progression. The results revealed that two proteins (ORM and CP) present elevation levels in patients who progressed to greater albumin levels, compared to non-progresses, which suggests a potential predictive value. This fact allows us to identify normoalbuminuric patients with greater risk of development high albuminuria.

In conclusion, the use of multi-proteomic approach for the study of albuminuria development has allowed the identification of different proteomics profiles associated with the pathology. These proteins would allow having a better stratification of these individuals as well as to have a better understanding of molecular pathways involved in the progression of the cardio-renal disease.

# Abreviaturas



## *Abreviaturas*

2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial en gel
2-DE	Electroforesis bidimensional
A2GL	Alfa-2 glicoproteína rica en leucina
AA	Albuminuria alta
AAM	Albuminuria alta mantenida
ACD	Ácido citrato-dextrosa
ACN	Acetonitrilo
ACP	Análisis de componentes principales
ACR	Relación albúmina/creatinina
AMA	Albuminuria muy alta
AMBIC	Bicarbonato amónico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
APC	Aloficocianina
APO AI	Apolipoproteína AI
APO AII	Apolipoproteína AII
APS	Persulfato amónico
ARB	Antagonista de los receptores de angiotensina II
AT1 R	Receptores de angiotensina I
AT2 R	Receptores de angiotensina II
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Control
CEs	Células endoteliales
CFAB	Complemento factor B
CHADL	Condroadherina
CHAPS	[3-[(3-Colaamidopropil) dimetilamonio]-1 propanosulfonato]
CHD7	Proteína 7 de unión al cromodominio helicasa AND
CID	Disociación inducida por colisión
CO2	Dióxido de carbono
CP	Ceruloplasmina
CV	Cardiovascular
DAPI	4',6-diamino-2-fenilildol
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Medio MEM modificado por Dulbecco



## Abreviaturas

DMF	Dimetilformamida anhidra
dnAA	Albuminuria alta <i>de novo</i>
DNJC9	Proteína homóloga DnaJ subfamilia C miembro 9
DO	Daño orgánico
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eGFR	Ratio del filtrado glomerular estimado
EGM-2	Medio de crecimiento endotelial
EMVs	Vesículas derivadas de células endoteliales
ERC	Enfermedad renal crónica
ERS	Estrés del reticulo endoplásmico
ESC	Sociedad Europea de Cardiología
ESH	Sociedad Europea de Hipertensión
ESI	Ionización por electrospray
F13B	Factor XIII de coagulación cadena B
FA	Formaldehído
FBS	Suero fetal bovino
FDR	Tasa de falsos positivos
FHR2	Proteína 2 relacionada con el complement factor H
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FRCV	Factores de riesgo cardiovascular
GNS	Suero normal de cabra
GPS	Glutamina-penicilina-estreptomicina
HCl	Ácido clorhídrico
HEMO	Hemopexina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPT	Haptoglobina
HTA	Hipertensión arterial
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
IAA	Iodoacetamida
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

## *Abreviaturas*

IEF	Isoelectroenfoque
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IGHA2	Inmunoglobulina cadena alfa-2 región C
IGHG2	Inmunoglobulina gamma-2 región C
IGHG3	Inmunoglobulina gamma-3 región C
IGKC	Inmunoglobulina cadena ligera kappa
IgM	Inmunoglobulina M
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
ITIH4	Inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4
iTRAQ	Marcaje isobárico para la cuantificación absoluta y relativa
KBr	Bromuro de potasio
KNG1	Kininógeno 1
LC	Cromatografía líquida
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LC-MS/MS	Cromatografía líquida conectada a espectrometría de masas en tándem
LV302	Inmunoglobulina lambda cadena V-III región LOI
m/z	Masa/Carga
MALDI	Ionización por desorción con láser asistida por matriz
MEM	Medio basal de Eagle
min	Minuto
ml	Mililitro
MM	Masa molecular
mm	Milímetro
MPs	Micropartículas
MS	Espectrometría de masas
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MVs	Microvesículas
N	Normoalbuminuria
NALP9	Proteína 9 que contiene dominios NACHT, LRR y PYD
NO	Óxido nítrico
ORM1	Alfa-1 glicoproteína ácida

## *Abreviaturas*

ORML2	Proteína 2 similar alfa-1 glicoproteína ácida
ORNT1	Transportador 1 de la ornitina mitochondrial
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofila Peridinina
PMF	Huella peptídica
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsufonilo
PMVs	Vesículas derivadas de plaquetas
PON1	Paraoxonasa 1
QQQ	Triple cuadrupolo
ROC	Característica Operativa del Receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAMP	Componente P del amiloide sérico
SCORE	Evaluación sistemática del riesgo coronario
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SHBG	Globulina de unión a hormonas sexuales
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRM	Monitorización por reacción seleccionada
TEAB	Bicarbonato de trietilamonio
TEMED	N,N,N',N',-51 tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TOF/TOF	Tiempo de vuelo en tándem
UBP47	Ubiquitina hidrolasa carboxil-terminal 47
VCAM-1	Molécula de adhesión de célula vascular-1
VEs	Vesículas extracelulares
VTDB	Proteína de unión a vitamin D
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrómetro

# **Introducción**



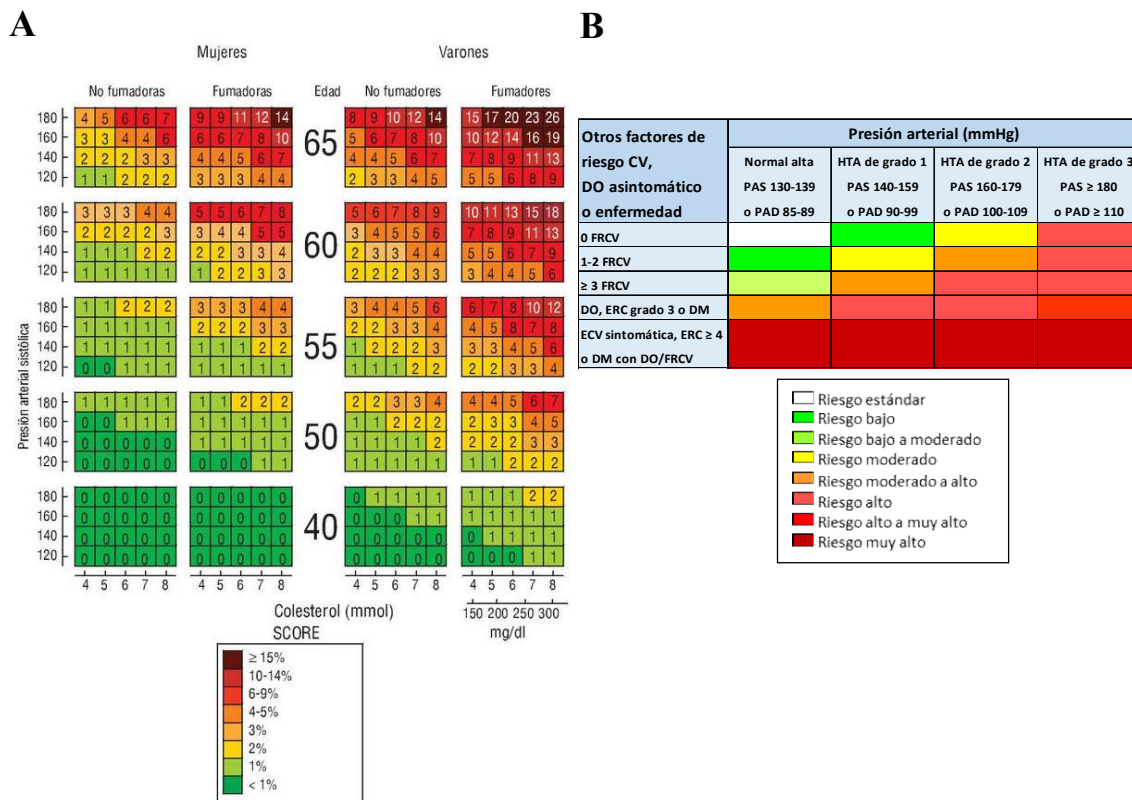
## 1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de discapacidad y mortalidad en los países más desarrollados y presenta una creciente prevalencia en los países en vías de desarrollo<sup>1,2</sup>. Según los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 31% de la mortalidad total a nivel mundial se debe a las ECV<sup>3</sup>, lo que supone un importante problema de salud pública. La evaluación del riesgo de desarrollar futuras complicaciones cardiovasculares se considera una excelente estrategia para el diagnóstico precoz y manejo de estas ECV. En los últimos años se han realizado diversas tablas para calcular la estimación del riesgo de sufrir un evento CV a lo largo del tiempo (Framingham, NCEP-ATP III, SCORE, ASSIGN, Reynolds, QRISK, PROCAM) basadas en estudios de cohortes poblacionales<sup>4,5,6,7,8,9</sup>. Las recomendaciones en la prevención cardiovascular hacen incapié en la valoración del riesgo global y no de los factores de riesgo a nivel individual debido a que los individuos que tienen ECV presentan más de un factor de riesgo cardiovascular. Actualmente, los métodos más comúnmente utilizados se basan en la función de Framingham y tablas europeas del proyecto SCORE<sup>10</sup> (*Systematic COronary Risk Evaluation*). El estimador SCORE permite calcular el riesgo de muerte cardiovascular a 10 años atendiendo a la edad, sexo, tabaquismo, colesterol y presión arterial (PA). Estas tablas, teniendo en cuenta la gran variabilidad geográfica de Europa, se encuentran divididas en 2 grupos, países de alto y bajo riesgo cardiovascular<sup>11</sup>, atendiendo a la función del riesgo cardiovascular del país donde se utilicen. España pertenece al segundo grupo (Figura 1A). La novedad más importante de este modelo es la estimación del riesgo de muerte por todas las manifestaciones aterotrombóticas, cardíacas y no cardíacas (ictus, insuficiencia coronaria, insuficiencia arterial periférica, aneurismas) y no sólo por enfermedad coronaria como ocurría en la escala Framingham. Sin embargo, estas guías no tienen en cuenta el daño orgánico asintomático relacionado con la hipertensión arterial (HTA). Por ello, se debe considerar estos marcadores en la predicción individual del riesgo cardiovascular más allá de los factores de riesgo individuales<sup>12,13</sup>.

Durante más de una década, las guías internacionales para el manejo de la HTA (Sociedad Europea de Hipertension (ESH) y la Sociedad Europea de Cardiología (ESC)<sup>14,15,16,17</sup> han estratificado el riesgo de mortalidad CV a 10 años en bajo, moderado

## Introducción

o alto riesgo (Figura 1B). Esta clasificación se ha realizado en base a los valores de PA, FRCV, daño orgánico asintomático, presencia de diabetes, ECV sintomática y enfermedad renal crónica (ERC).



**Figura 1. Estratificación del riesgo cardiovascular.** A) Tabla “SCORE” para estimar el riesgo cardiovascular a 10 años teniendo en cuenta el sexo, edad, PAS, tabaquismo y nivel de colesterol, expresado en porcentaje (de 0 a > 15 %). B) Tabla de estratificación por la Sociedad Europea de Cardiología del riesgo CV en categorías de riesgo bajo, moderado, alto y muy alto basado en los valores de PA, factores de riesgo cardiovascular, DO asintomático, diabetes mellitus, ERC y ECV sintomática. CV: cardiovascular; DO: daño orgánico; ECV: enfermedad cardiovascular; ERC: enfermedad renal crónica; FRCV: factor de riesgo cardiovascular; DM: diabetes mellitus; HTA: hipertensión arterial; PA: presión arterial; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica.

Diversos estudios epidemiológicos han contribuido notablemente en la identificación de los múltiples factores de riesgo asociados al pronóstico y desarrollo de las ECV, siendo la PA el principal factor de riesgo relacionado con la mortalidad causando 9.4 millones de muertes cada año<sup>18</sup>. Además, existe una relación directa entre los valores de PA con la incidencia de eventos cardiovasculares (accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, muerte súbita, fallo cardíaco, enfermedad arterial periférica) y enfermedad renal en etapa terminal<sup>19,20,21</sup>.

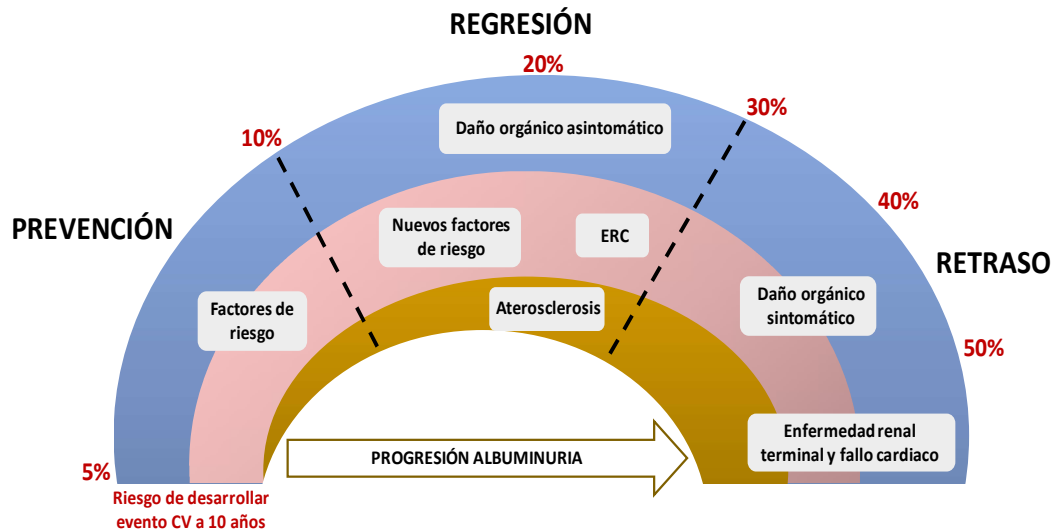
## 1.1. CONTINUUM CARDIORRENAL

El término de “continuum cardiovascular” fue descrito por primera vez por Dzau y Braunwald como un nuevo paradigma para la patogénesis de ECV<sup>22</sup>. Actualmente es más conocido como “continuum cardiorrenal”, debido a la gran asociación entre ECV y enfermedad renal como enfermedades que comparten los mismos factores de riesgo etiopatogénicos y cuyos procesos fisiopatológicos resultan en un daño vascular progresivo<sup>23</sup>. Este “continuum cardiorrenal” se divide en 3 principales etapas (Figura 2). En la primera etapa, únicamente se encuentran presentes los factores de riesgo cardiovascular sin evidencias de daño en los órganos diana. Un control adecuado de la PA y del resto de factores de riesgo cardiovasculares modificables puede prevenir el desarrollo del daño orgánico asociado a un aumento de la morbilidad cardiorrenal y desarrollo de eventos cardiovasculares<sup>24,25,26</sup>. En la etapa intermedia se detectan daños orgánicos subclínicos (asintomáticos) y procesos de daño vascular asociados a la aparición de aterosclerosis como consecuencia de la progresión del proceso fisiopatológico siendo, por tanto, un determinante del riesgo de ECV total y un decline de la función renal. Las estrategias terapéuticas en esta fase pueden revertir el daño orgánico. Además, diversos estudios mostraron que la regresión de la albuminuria y de la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) tienen como consecuencia una disminución del número de eventos CV<sup>27,28,29</sup>. Se han logrado grandes avances en el conocimiento de los mecanismos que dan lugar al desarrollo de la albuminuria y su relación con el fallo cardiorrenal. El estudio LIFE (*Losartan Intervention for Endpoint reduction*) permitió asociar la presencia de albuminuria con un mayor riesgo de la mortalidad cardiovascular en pacientes hipertensos con HVI<sup>30</sup>. En el estudio ONTARGET (*Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial*), realizado con pacientes con ECV subclínica, se observó que la excreción urinaria de orina en rangos de albuminuria era un predictor de insuficiencia renal crónica terminal<sup>31</sup>.

Por último, la tercera etapa está caracterizada por la presencia de ECV establecida y/o de las fases avanzadas de enfermedad renal debido a la progresión del daño cardiovascular. Este proceso conduce al desarrollo de eventos cardiovasculares y progresión de enfermedad renal terminal. Un control estricto de la HTA y del resto de factores de riesgo en esta etapa únicamente logra retrasar la incidencia de nuevos eventos cardiovasculares o renales. Por tanto, una buena estrategia de prevención



cardiovascular será aquella en la que se identifiquen pacientes que se encuentren en las dos primeras etapas del “continuum”, debido a que aún no han aparecido daños en órganos sintomáticos y, por consiguiente, se pueden revertir todos estos procesos.



**Figura 2. Representación gráfica del “continuum cardiorrenal”.** Este “continuum” presenta una secuencia de eventos que reflejan los diferentes estadios de la enfermedad cardiovascular y renal, los cuales están relacionados entre sí. Además, se muestra el porcentaje aproximado de sufrir un evento CV a 10 años. CV: cardiovascular; ERC: enfermedad renal crónica. (Adaptado de Ruilope<sup>32</sup> y Zanchetti<sup>33</sup>).

## 2. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

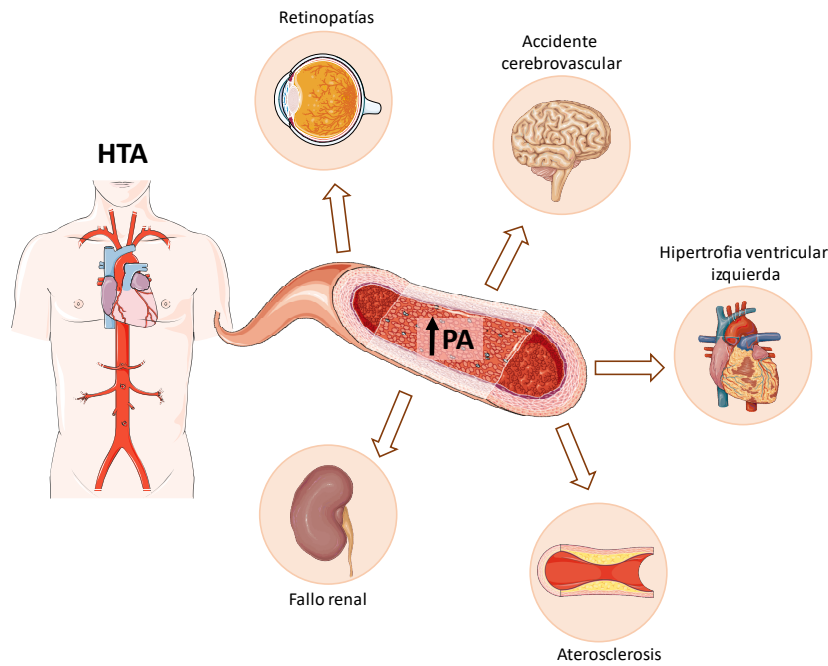
La hipertensión arterial es una patología crónica de etiología multifactorial caracterizada por la elevación sostenida de la PA por encima de los valores considerados normales. La PA es la presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias y depende tanto de la fuerza bombeada por el corazón (gasto cardiaco) como del calibre de las arterias (resistencia periférica). El valor de la PA se mide en milímetros de mercurio (mmHg) y se calcula en base a dos mediciones, la PAS que se corresponde al máximo valor de la PA cuando el corazón se contrae (sístole) y la PAD que se da cuando el músculo cardiaco se relaja (diástole) y corresponde al valor mínimo de PA<sup>34,35</sup>. Los valores de PA que definen la HTA son los siguientes: PAS  $\geq 140$  mmHg y/o PAD  $\geq 90$  mmHg.

Existen dos tipos diferentes de hipertensión según el origen. La HTA esencial o primaria, de etiología desconocida, que corresponde al 90-95% de los casos con una fuerte influencia hereditaria<sup>36</sup> y la HTA secundaria, que se da en el 5-10% restante, que es debida a una causa directamente responsable del incremento de las cifras de PA y puede ser potencialmente curable<sup>37</sup>. La HTA esencial es un desorden heterogéneo

debido a diferentes causas como son la interacción entre variaciones genéticas y factores ambientales como el estrés, dieta y actividad física. Sin embargo, en la mayoría de los casos no hay una causa clara y se plantea la hipótesis de ser causada por múltiples factores que actúan de manera conjunta<sup>38</sup>.

En términos generales, la prevalencia de la HTA se encuentra entre el 30-45% de la población total, con un fuerte aumento en edades más avanzadas<sup>39</sup>. Datos de estudios de cohortes prospectivos han mostrado que el incremento de 20 mmHg en la PAS o 10 mmHg en la PAD, duplicaría el riesgo de desarrollar ECV en todo el rango de PA en individuos con una edad comprendida entre 40 y 70 años<sup>40</sup>. Además, se observó en un meta-análisis, que la intervención farmacológica para disminuir los niveles de PA producía una disminución sustancial en el riesgo de desarrollar futuras complicaciones cardiovasculares<sup>41</sup>.

El incremento de PA produce alteraciones en la mayoría de los órganos, sin embargo, cabe destacar un daño específico en determinados órganos dianas como son el corazón, el riñón y el cerebro (Figura 3). El efecto que se produce sobre el corazón es la HVI debido a que el incremento de PA sobre el ventrículo produce un engrosamiento del mismo como un mecanismo compensatorio<sup>42</sup>. Las fibras del músculo del corazón con hipertrofia se acortan y engrosan lo que implica que tengan una menor capacidad para relajarse<sup>43</sup>. Este proceso se asocia con una disfunción tanto diastólica como sistólica, lo que conlleva al desarrollo de una insuficiencia cardíaca. En cuanto a la afectación renal, se producen alteraciones en la barrera glomerular dando lugar a un deterioro progresivo del filtrado que puede estar acompañado de un aumento en la cantidad de albumina excretada en la orina<sup>44</sup>. Además, el aumento de la PA promueve la formación de placas ateroscleróticas en las arterias cerebrales y arteriolas, produciendo oclusiones y daño isquémico<sup>45,46</sup>. A nivel del ojo, se origina un daño en la microcirculación de la retina debido a la dilatación de las arteriolas precapilares con la consecuente disrupción de la barrera hematorretiniana. Estas alteraciones darán lugar a la retinopatía hipertensiva.



**Figura 3. Imagen representativa de los principales efectos causados por la HTA en los órganos diana.** HTA: hipertensión arterial, PA: presión arterial.

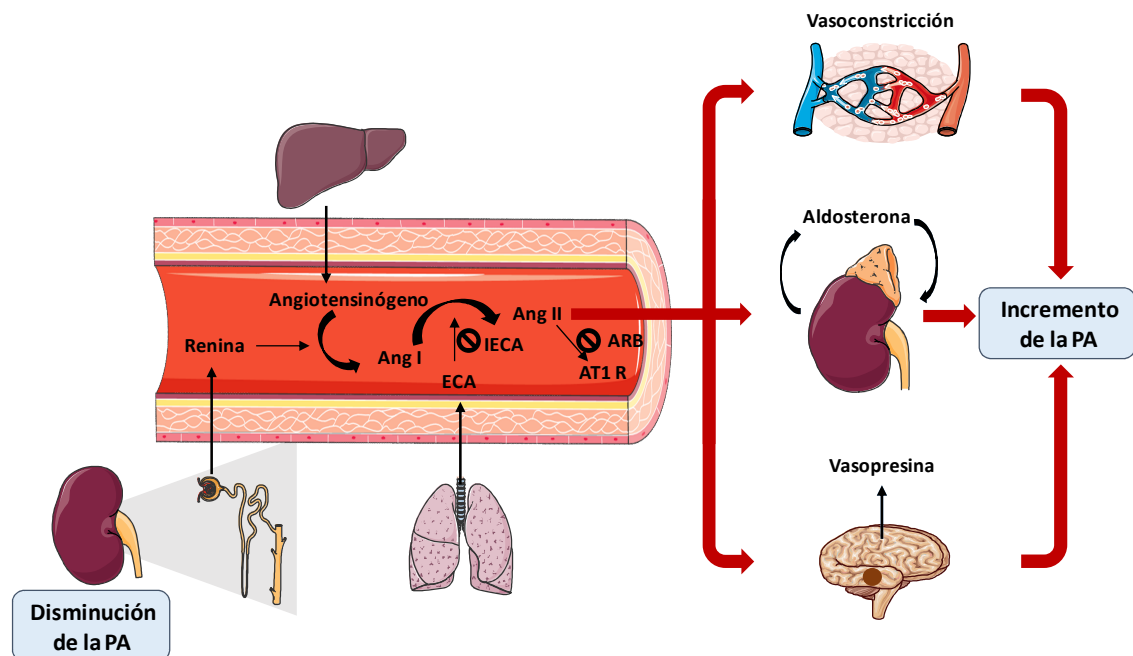
Una buena estrategia de prevención para reducir la PA y el número de factores de riesgo cardiovascular debe comenzar con cambios en el estilo de vida como es la restricción de la ingesta de sal, reducción de peso, ejercicio físico y el hábito de dejar de fumar<sup>47</sup>. Si a pesar de estos cambios, los niveles de PA siguen siendo elevados, es necesario el uso de fármacos antihipertensivos como son los diuréticos, alfa y beta bloqueantes, antagonistas de calcio y los bloqueantes del sistema renina-angiotensina (SRA). Estos últimos, se consideran la mejor elección de tratamiento en el manejo de los pacientes hipertensos de alto riesgo cardiovascular, tanto en monoterapia como combinados<sup>48</sup>.

## 2.1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

El Sistema Renina-Angiotensina es un sistema hormonal que desempeña un papel fundamental en la homeostasis de la PA<sup>49</sup> y en la disminución de la cantidad de albumina excretada en orina<sup>50</sup>, siendo un mediador clave de la progresión del daño orgánico renal y cardiovascular (Figura 4). Este sistema regula directamente las resistencias vasculares periféricas e indirectamente el volumen intravascular.

La renina producida por los riñones, se libera a la sangre por varios factores: activación del nervio simpático, hipotensión renal arterial y por una disminución de la liberación de sodio a los túbulos distales del riñón. Esta enzima ejerce una función como proteasa transformando el angiotensinógeno, producido por el hígado, en angiotensina I (Ang I).

La Ang I se convierte en angiotensina II (Ang II) por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los efectos de la Ang II sobre los vasos sanguíneos son la vasoconstricción que da lugar al aumento de la resistencia vascular periférica y PA. Además, actúa sobre la corteza adrenal estimulando la secreción de aldosterona, hormona que actúa en las células epiteliales tubulares de los riñones y se produce un incremento de la reabsorción de sodio desde el fluido tubular a la sangre mientras que al mismo tiempo causa que se excrete el potasio en la orina. Otra de las funciones de la Ang II es liberar la vasopresina por la glándula pituitaria, lo que conlleva a un incremento de la retención de fluido por los riñones y estimula la sensación de sed. El conjunto de estos procesos da lugar a un aumento del volumen sanguíneo y, por lo tanto, un aumento de la PA<sup>51</sup>.



**Figura 4. Sistema Renina-Angiotensina en la regulación de la presión arterial y sus potenciales dianas terapéuticas.** PA: presión arterial; Ang I: angiotensina I; Ang II: angiotensina II; ECA: enzima convertidora de angiotensina; IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; AT1 R: Receptores de angiotensina I; ARB: antagonista de los receptores de angiotensina II.

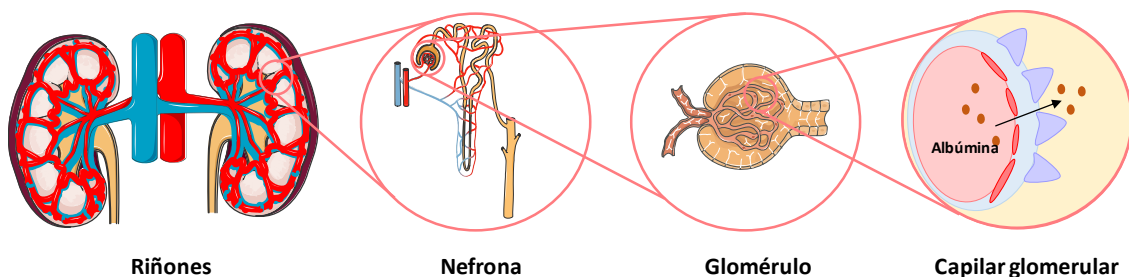
Los fármacos que actúan como supresores del SRA ejercen un importante papel en el tratamiento de la HTA y fallo cardíaco logrando una reducción significativa de la progresión del daño renal además de revertir la HVI y reestablecer la función endotelial. Estos fármacos actúan a distintos niveles del SRA y se dividen en dos grupos: los Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA) y los Antagonistas de los Receptores de la Angiotensina II (ARB). Los IECA se unen a la ECA por la zona

activa produciendo una inhibición de la conversión de la Ang I a Ang II. Esto ocasiona una disminución en los niveles de Ang II, y por el contrario produce un aumento en los niveles de Ang I, que conlleva a una reducción de aldosterona, disminuyendo la PA. Por otro lado, los ARB producen un bloqueo competitivo y selectivo de los receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1 R) inhibiendo las acciones de la Ang II y estimulando los receptores de angiotensina II tipo 2 (AT2 R). Este proceso dará lugar a la vasodilatación en el riñón de las arteriolas aferente y eferente conllevando a un aumento de la reabsorción tubular proximal de sodio y una reducción de la secreción de vasopresina y aldosterona. El efecto combinado de estos procesos produce una reducción de la presión sanguínea.

## 2.2. ALBUMINURIA

La albuminuria es un proceso patológico que se caracteriza por la presencia de albúmina en orina a consecuencia del daño producido en los riñones, lo que conlleva a un deterioro en el filtrado del glomérulo. La albúmina es una de las proteínas plasmáticas más importantes en el cuerpo debido a su papel en el mantenimiento de la presión osmótica coloidal intravascular<sup>52</sup>. Los riñones desempeñan un papel importante en la retención de estas proteínas plasmáticas que atraviesan la barrera glomerular mediante su reabsorción en los tubulos renales. Por tanto, la detección de cantidades anormales de esta proteína es un indicador temprano de daño renal.

Las principales causas de la albuminuria en pacientes con HTA son los cambios hemodinámicos e inflamatorios originados por el incremento de la PA que dan lugar la elevación de la presión intraglomerular y la disfunción endotelial, caracterizada por un incremento de la permeabilidad de la barrera glomerular<sup>53</sup>. Esta situación conlleva a un escape de la albúmina al espacio extravascular (Figura 5).



**Figura 5.** Representación gráfica de la estructura vascular del riñón y filtración de albúmina al espacio extracelular.

Los valores de albuminuria se determinan en función del cociente entre la concentración de albúmina y creatinina en la orina, conociéndose como la relación albúmina/creatinina (ACR). Para calcular este valor se compara la albúmina frente a la concentración de creatinina con el objetivo de compensar las variaciones en la concentración de la orina de las distintas muestras. Atendiendo a estos niveles detectados en orina podemos distinguir 3 grupos diferentes: normoalbuminuria (N), cuyos niveles de albúmina basales son considerados normales (<20mg/g ACR en hombres o <30mg/g ACR en mujeres), albuminuria alta (AA) con niveles comprendidos entre 20-200 mg/g ACR en hombres y 30-300 mg/g ACR en el caso de las mujeres y albuminuria muy alta (AMA) con niveles superiores a 200 ó 300 mg/g ACR, en hombres y mujeres, respectivamente<sup>54</sup> (Tabla 1).

	Albúmina (mg/L)	Muestra de orina		
		Cociente albúmina/creatinina		
		Género	mg/mmol	mg/g
Normoalbuminuria	< 10	H	< 1.25	< 10
		M	< 1.75	< 15
Normoalbuminuria alta	10 a < 20	H	1.25 a < 2.5	10 a < 20
		M	1.75 a < 3.5	15 a < 30
Albuminuria alta	20 a < 200	H	2.5 a < 25	20 a < 200
		M	3.5 a < 35	30 a < 300
Albuminuria muy alta	> 200	H	> 25	> 200
		M	> 35	> 300

**Tabla 1. Clasificación de la excreción anormal de albúmina en orina.** H: hombre; M: mujer. (Adaptado de Bover<sup>55</sup>).

La albuminuria es un marcador de disfunción vascular generalizada y un potente predictor del desarrollo de complicaciones cardiovasculares y renales, en pacientes con HTA y diabetes<sup>56</sup>. Por ello, diferentes Guías de Sociedades Científicas recomiendan la detección precoz de albuminuria<sup>57,58</sup>. La prevalencia de AA es de un 37,5% en pacientes con HTA y presenta una correlación positiva con la severidad de esta patología, siendo un marcador temprano de daño orgánico<sup>59</sup> y por tanto asociada a una alta incidencia de la morbilidad CV<sup>60</sup>. La detección temprana de AA así como el adecuado control de las cifras de PA tendrá un impacto importante en la prevención de las ECV y renales. Para ello, un adecuado tratamiento antihipertensivo constituye la base fundamental para el manejo de la AA. Sin embargo, se ha demostrado que hay un determinado número de pacientes con HTA tratados crónicamente con inhibidores del SRA que presentan una elevada prevalencia de albuminuria e incluso aparición de albuminuria *de novo*<sup>61</sup> produciéndose un mayor desarrollo de ECV<sup>62,63</sup> en estos sujetos. Este hecho abre la

posibilidad de que en algunos pacientes exista un cierto grado de ineficacia y respuesta incompleta al tratamiento. Por ello, la búsqueda de potenciales dianas pronósticas mediante diferentes abordajes proteómicos supone una excelente herramienta para identificar pacientes normoalbuminúricos con mayor riesgo a desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o renal con el fin de adoptar una estrategia preventiva y evitar el desarrollo de estas enfermedades.

### **3. PROTEÓMICA**

La secuenciación completa del genoma humano constituyó un gran hito en la biomedicina<sup>64</sup>, proporcionando una importante base de conocimientos orientada a la investigación en áreas como el diagnóstico, terapia génica, descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y desarrollo de terapias personalizadas. En la actual era post-genómica, la Proteómica ha ido ganando terreno yendo más allá: la caracterización del proteoma humano. Por analogía con el concepto de genoma, uniendo los términos de “proteína” y “genoma”, Mark Wilkins en 1994 acuñó el término “proteoma” para indicar el conjunto de proteínas expresadas en un organismo o sistema biológico<sup>65</sup>. El proteoma de un organismo es un elemento muy dinámico debido a que sus componentes varían en función del tejido, célula o compartimento celular que se estudie y esos, a su vez, pueden cambiar debido a modificaciones en su ambiente, como la acción de fármacos, situaciones de estrés o el estado fisiopatológico. La Proteómica es, por tanto, la ciencia estudia y compara a gran escala la expresión de proteínas procedentes de la expresión génica y también aquellas generadas por las distintas modificaciones post-traduccionales en diferentes situaciones fisiológicas, patológicas o a lo largo de un proceso de desarrollo con el fin de caracterizar procesos biológicos y descifrar los mecanismos de la expresión genética<sup>66,67,68,69,70</sup>.

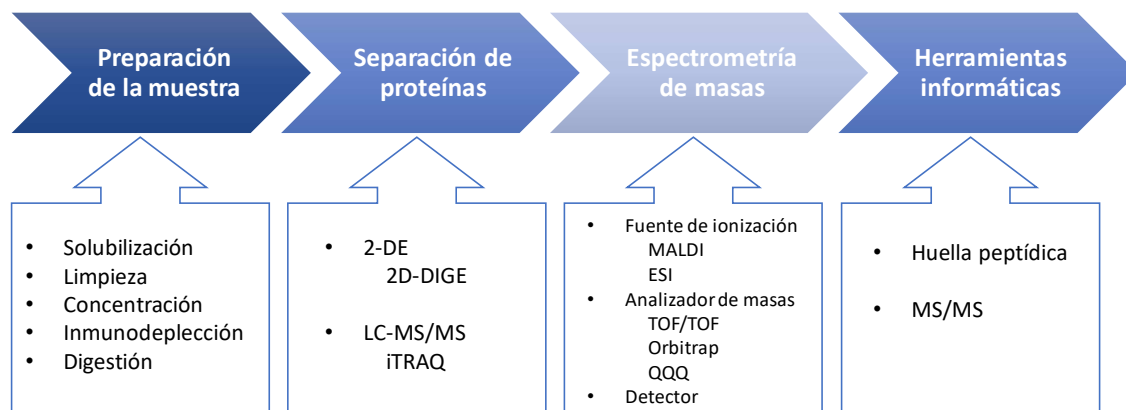
En el caso concreto de los análisis proteómicos asociados a patologías, es posible identificar proteínas que permitan diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma. Dichas proteínas se conocen con el nombre de biomarcadores de enfermedad<sup>71</sup>, es decir, moléculas que son modificadas o se encuentran en concentraciones anómalas en una enfermedad específica. Los enfoques proteómicos clásicos para la identificación de estos biomarcadores se basan en la expresión diferencial de proteínas en muestras biológicas procedentes de dos o más grupos diferentes (individuos sanos frente a patológicos, pacientes con diferentes grados de

enfermedad, etc.) mediante el uso combinado de la electroforesis bidimensional (2-DE) y la espectrometría de masas (MS). Sin embargo, el rápido desarrollo y progreso en la instrumentación analítica, especialmente en la MS con la introducción de potentes espectrómetros de masas unidos las mejoras en las técnicas de ionización suave, han permitido realizar identificaciones a gran escala de las proteínas presentes en una muestra. Este campo en la Proteómica actual se conoce con el nombre de “*shotgun proteomics*”. Por otro lado, el desarrollo de la bioinformática ha sido una herramienta clave para el avance de la proteómica, permitiendo coleccionar, almacenar, procesar y visualizar la gran cantidad de datos generados por los estudios proteómicos.

### 3.1 MÉTODOS EMPLEADOS EN PROTEÓMICA

Existe una gran variedad de técnicas, métodos, reactivos, instrumentación y herramientas informáticas disponibles para el diseño, realización y análisis de datos en el ámbito de la Proteómica<sup>72,73,74</sup>. Para poder representar el flujo de trabajo llevado a cabo en un experimento proteómico, así como la enorme variedad, previamente mencionada, se ha elaborado una figura esquemática donde queda resumido (Figura 6). En este esquema se representan las técnicas que hemos utilizado para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Cabe destacar que el éxito de un experimento proteómico es críticamente dependiente de la etapa de preparación de la muestra, por lo que una adecuada obtención y preparación de ésta va a estar directamente relacionada con la cantidad y calidad de los datos obtenidos. Además, se debe tener en cuenta que las distintas etapas están estrechamente relacionadas entre sí por lo que resulta fundamental que las técnicas empleadas en las primeras etapas sean compatibles con el análisis de MS.





**Figura 6. Representación esquemática del flujo de trabajo general llevado a cabo en nuestros experimentos proteómico.** Se representan las cuatro etapas principales: preparación de muestra, separación de proteínas, análisis por espectrometría de masas y herramientas informáticas para analizar los resultados obtenidos.

### 3.2. ABORDAJE MULTI-PROTEÓMICO DESARROLLADO EN ESTA TESIS DOCTORAL

En este trabajo se han llevado a cabo distintos abordajes proteómicos diferenciales en plasma y VEs circulantes del plasma con el objetivo de identificar perfiles moleculares asociados al desarrollo de la albuminuria alta y marcadores de daño orgánico crónico en pacientes hipertensos tratados crónicamente con supresores del SRA. Los métodos utilizados en esta Tesis Doctoral quedan resumidos a continuación.

#### A) Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE)

Esta metodología se basa en el marcaje fluorescente de las proteínas mediante fluorocromos derivados de la cianina CyDye (Cy2, Cy3 y Cy5) previo a su separación. Una vez marcadas, se mezclan y se separan en el mismo gel. Los diferentes extractos proteicos son visualizados de forma individual mediante la excitación de las diferentes marcas a su longitud de onda específica<sup>75</sup>. La principal ventaja de esta técnica es que permite el análisis simultáneo de dos muestras de proteínas en un único gel y una alícuota del estándar interno constituido por una mezcla de todas las muestras que componen el experimento, lo que disminuye la variabilidad experimental. Al final de la separación de proteínas, la cuantificación relativa de las proteínas procedentes de las muestras se obtiene comparando las intensidades de fluorescencia de las proteínas en la misma mancha proteica. Este método de fluorescencia ha mejorado mucho la capacidad de la 2-DE para realizar análisis comparativos en relación a la sensibilidad, reproducibilidad y fiabilidad.

### B) Análisis cuantitativo diferencial de proteínas con marcaje iTRAQ

El análisis de expresión diferencial de proteínas mediante marcadores isobáricos (iTRAQ, *isobaric tags for relative and absolute quantitation*) consiste en la digestión de proteínas con tripsina y marcaje de los péptidos resultantes con un reactivo diferente para cada muestra. Estos marcadores están compuestos de tres regiones: un grupo reactivo, un grupo compensador y un grupo reportero. El grupo reactivo reacciona con el grupo amino de los residuos de lisina y el extremo N-terminal de todos los péptidos. El grupo compensador se utiliza para igualar la masa total. De esta manera, y dado que la suma de los pesos moleculares de las tres partes de cada reactivo es constante, cada péptido marcado se detecta como un pico único en el espectro MS. Sin embargo, durante la fragmentación por espectrometría de masas en tándem (MS/MS), los péptidos marcados liberan los grupos reporteros, pudiendo ser detectados en el espectro como iones con relaciones  $m/z$  de 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 y 121. La cuantificación diferencial de proteínas de las muestras se obtiene por comparación de las intensidades de las señales MS de los péptidos. Este análisis requiere un fraccionamiento previo en función de la complejidad de la muestra seguida de LC-MS/MS, lo que permite la identificación y cuantificación de miles de péptidos en un único experimento.

### C) Validación de proteínas por SRM-LC-MS/MS

La técnica de monitorización por reacción seleccionada (SRM) se ha empleado para la cuantificación y validación de las proteínas diferencialmente expresadas tanto en plasma como en las VEs circulantes del plasma, identificadas en los análisis cuantitativos mediante 2D-DIGE y iTRAQ. Esta técnica se realiza en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (QqQ). El primer cuadrupolo (Q1) se emplea para seleccionar un ión precursor de masa conocida. Este ion pasa al cuadrupolo 2 (q2), donde es fragmentado mediante disociación inducida por colisión (CID). Los fragmentos generados pasan al cuadrupolo 3 (Q3) donde son analizados y las transiciones precursor-fragmento se utilizan para cuantificar el péptido de forma que tenemos dos selecciones de masa carga: una para el péptido precursor ( $m/z$  1) y otra para los fragmentos de ese péptido o transiciones ( $m/z$  2). La principal ventaja de esta metodología se debe a su gran sensibilidad y selectividad<sup>76</sup>.

### **3.3. PROTEÓMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA HIPERTENSIÓN Y DAÑO RENAL**

Los avances en las tecnologías de alto rendimiento y la disponibilidad de grandes bases de datos han contribuido notablemente en el desarrollo de las ciencias -ómicas durante la última década. El término -ómica se define como una aproximación multidisciplinar que permite la evaluación no sesgada de los procesos fisiopatológicos sin hipótesis previas establecidas ni preselección de moléculas dianas<sup>77</sup>. Por ello, el estudio del continuo cardío-renal a través de las -ómicas se realiza como un “todo”, identificando perfiles moleculares asociados a la enfermedad para estudiar los mecanismos fisiopatológicos que la cursan. Además, la evaluación de dichos perfiles en los pacientes permitirá estudiar la susceptibilidad de desarrollar una enfermedad, mejorar el diagnóstico, elegir un adecuado tratamiento, así como también estudiar la respuesta a los mismos. En el ámbito de las ECV, se ha centrado en la búsqueda de biomarcadores con valor pronóstico, diagnóstico y dianas terapéuticas. Sin embargo, a pesar de los grandes avances en los últimos años en el estudio de estas enfermedades, siguen siendo la principal causa de mortalidad a nivel mundial.

En relación con la HTA, como principal factor de riesgo de las ECV, el número de estudios proteómicos es limitado. Entre ellos caben destacar algunos desarrollados en tejidos (riñón y corazón) de modelos animales y en fluidos biológicos (plasma y orina) realizados en humanos, que resumimos a continuación.

#### **3.3.1. Estudios proteómicos en modelos animales**

El desarrollo y aplicación de las técnicas proteómicas en tejidos de animales para el estudio de la enfermedad renal en modelos de hipertensión, han contribuido notablemente al conocimiento de proteínas y procesos moleculares directamente implicados en la patogénesis. Entre ellos, cabe mencionar un trabajo realizado por Thongboonkern y col<sup>78</sup> en el año 2002 donde estudiaron mediante 2-DE, el proteoma renal de ratas Sprague-Dawley en un modelo de apnea obstructiva del sueño donde los animales desarrollaban hipertensión inducida por hipoxia (característica de la apnea obstructiva del sueño). Los resultados del análisis proteómico mostraron niveles alterados de proteínas que estaban implicadas en la ruta de regulación del sistema renal calicreína. En cuanto a los estudios realizados en corazón, Jin y col<sup>79</sup> en el año 2006, encontraron alteraciones en proteínas relacionadas con la glucólisis, fosforilación oxidativa mitocondrial, estrés oxidativo y metabolismo energético celular antes de la

aparición de la hipertensión en el miocardio ventricular izquierdo de ratas espontáneamente hipertensas. Además, el estudio llevado por Delbosc y col<sup>80</sup> (2008) en aortas de ratas con diferentes susceptibilidades a desarrollar hipertensión (Fischer and Brown Norway) mostró un incremento de los niveles de ubiquitina, músculo liso 22 $\alpha$ , timosina  $\beta$ 4 y el fragmento C-terminal de filamina A en las ratas Fischer con mayor remodelación de la pared arterial. Estos marcadores podrían ser de gran utilidad para medir el daño vascular inducido por la hipertensión. Todos estos datos ponen de manifiesto el enorme potencial que tienen estas estrategias proteómicas para estudiar determinadas rutas moleculares en modelos animales específicos.

### **3.3.2. Estudios proteómicos en humanos**

Debido a la gran aplicabilidad que presentan los fluidos biológicos en el ámbito clínico como fuente de biomarcadores con valor pronóstico y diagnóstico de enfermedad, la mayoría de los estudios proteómicos llevados a cabo en humanos para el estudio de la evolución de la albuminuria han sido realizados tanto en plasma como en orina.

#### **A) Plasma**

Con el fin de estudiar los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la progresión del daño renal, Pena y col<sup>81</sup> (2015) analizaron el plasma de individuos hipertensos con normoalbuminuria y albuminuria alta mediante LC-MS donde encontraron alteraciones en proteínas plasmáticas relacionadas con la fibrosis, inflamación y angiogénesis que permitirían identificar pacientes con un mayor riesgo de progresar a enfermedad renal más allá de los marcadores renales establecidos en hipertensión y diabetes mellitus tipo 2. En estudios realizados en pacientes albuminúricos con diabetes mellitus tipo 1<sup>82</sup> se vio una fuerte correlación entre fragmentos de kininógeno y el deterioro progresivo de la función renal. Además, se observó una asociación entre los niveles plasmáticos de pro-adrenomedulina con la PA frente a la masa ventricular izquierda y albuminuria en pacientes hipertensos, lo que se podría considerar un potencial biomarcador de daño orgánico<sup>83</sup>.

#### **B) Orina**

En relación a los estudios realizados en orina debemos mencionar el trabajo realizado por Jin y Col<sup>84</sup> (2012) en pacientes diabéticos donde vieron alterados los niveles de alfa-1 antitripsina, alfa-1 glicoproteína ácida y antígenos de células madre de la próstata en

pacientes que presentaban albuminuria alta, las cuales podrían contribuir a un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la disfunción renal y su asociación con la patogénesis de nefropatía diabética. Además, se ha relacionado un panel de 4 proteínas (uromodulina, progranulina, clusterina y alfa-1 glicoproteína ácida) con la predicción del daño renal temprano en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, lo que puede ser de gran utilidad para predecir futuras complicaciones renales<sup>85</sup>. Los niveles alterados de uromodulina en orina de pacientes hipertensos parece que puede estar relacionado con la regulación de la reabsorción de sal<sup>86</sup>. Otros autores han encontrado en pacientes diabéticos varios marcadores urinarios asociados al desarrollo de albuminuria como IgG y N-acetilglucosaminosidasa<sup>87</sup> y  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína, también asociada con la inflamación y el daño tubular<sup>88</sup>.

En la actualidad, el número de estudios proteómicos que relacionan la hipertensión y la albuminuria son muy escasos, por ello, es de vital importancia abordar esta patología de una manera más exhaustiva para identificar perfiles moleculares asociados a la progresión del daño cardio-renal, así como la monitorización de estos pacientes en base a los niveles de albúmina en orina y, por tanto, estudiar la susceptibilidad a desarrollarla. Todo esto contribuiría a un mayor conocimiento a nivel global de los mecanismos moleculares a través de los cuales cursa la patología, así como una mejora en el diagnóstico, elección de un adecuado tratamiento y la evaluación de la respuesta a los mismos. Por ello pensamos que es de gran importancia aplicar las técnicas proteómicas al estudio del plasma en este tipo de pacientes.

## **4. EL PLASMA Y LAS VESICULAS EXTRACELULARES DEL PLASMA**

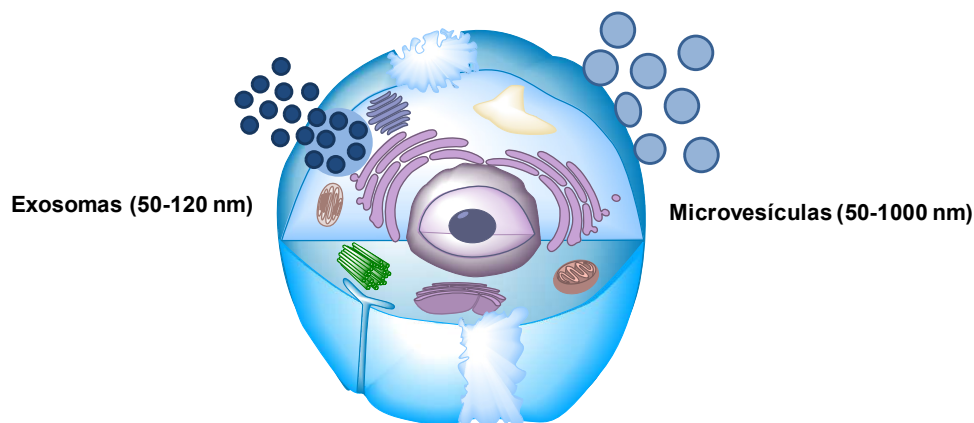
Como hemos visto previamente, mediante diferentes técnicas proteómicas se pueden analizar distintos tipos de muestras siendo los fluidos biológicos, tejidos, células y vesículas extracelulares los más comúnmente utilizados en la investigación biomédica.

El plasma sanguíneo es el fluido biológico más empleado en la realización de análisis proteómicos y en la práctica clínica con gran aplicabilidad para fines diagnósticos y pronósticos<sup>89,90,91,92</sup>. Las ventajas de usar este tipo de muestra se deben a su fácil obtención con métodos mínimamente invasivos y fácil manipulación. Además, contiene proteínas producidas por las células circulantes de la sangre y los tejidos que son

liberadas por diferentes motivos, así como también se encuentran presentes las vesículas extracelulares (VEs) lo que hace que su composición sea muy relevante como indicador de la fisiología de un individuo. Sin embargo, el principal factor limitante que presenta el plasma es la gran complejidad del proteoma ya que es una de las muestras con mayor contenido proteico y su gran rango dinámico, donde las proteínas más abundantes representan prácticamente el 90% de la composición proteica total. La búsqueda de proteínas candidatas a biomarcadores con valor pronóstico y diagnóstico, en plasma y en patologías relacionadas con las ECV, supone una excelente herramienta para la identificación de individuos en estadios tempranos de la enfermedad. Tal y como se demuestra en diversos trabajos desarrollados en nuestro laboratorio a lo largo de los últimos 5 años, hemos encontrado marcadores moleculares asociados a diferentes patologías como la estenosis aórtica<sup>93,94</sup>, síndrome coronario agudo<sup>95,96</sup>, infarto de miocardio<sup>97</sup>, aterosclerosis<sup>98</sup> e hipertensión<sup>99,100</sup>.

Las VEs son partículas rodeadas de membrana plasmática provenientes del interior de la célula o formadas directamente desde su membrana que se liberan como vía de comunicación al medio extracelular (Figura 7). En función de su biogénesis y tamaño se clasifican en dos tipos de VEs<sup>101</sup>:

- *Micropartículas (MPs) o microvesículas (MVs)*: se originan a partir de la modificación de la membrana celular lo que conlleva a una evaginación y formación de la vesícula hasta su liberación. El tamaño puede ser muy variable desde 50-1000 nm de diámetro. Estas vesículas son derivadas de plaquetas (PMVs) o de células endoteliales (EMVs)
- *Exosomas*: se forman dentro de los cuerpos multivesiculares y son excretados al espacio extracelular por fusión de la membrana plasmática con un tamaño comprendido entre 50-120 nm.



**Figura 7. Representación esquemática del proceso de formación y secreción de las vesículas extracelulares del plasma. MVs: Microvesículas.**

Estas vesículas se encuentran presentes tanto en el torrente sanguíneo como en otros fluidos biológicos (líquido sinovial, líquido ascítico, saliva, orina, leche materna y líquido cefalorraquídeo). Sin embargo, las más comúnmente estudiadas en la práctica clínica y que abordaremos en este estudio serán las VEs del plasma. Estas vesículas se liberan a la sangre de forma constitutiva o a consecuencia de un estímulo específico y su composición molecular variará en función del estadio en el que se encuentre la célula secretora transportando proteínas, glucolípidos y material genético como DNA y RNA lo que producirá modificaciones fenotípicas<sup>102</sup> y genotípicas<sup>103</sup> en las células diana<sup>104</sup>.

Este proceso está mediado por moléculas de superficie presentes en la membrana vesicular que le permite ser identificada y captada por la célula diana<sup>105</sup>.

Se han estudiado las distintas funciones biológicas en las que pueden participar agrupándolas con el término “comunicación celular sin contacto directo”, entre las que se encuentran la presentación de antígenos<sup>106</sup>, modificación del microambiente y educación celular a distancia<sup>107</sup>. Estas funciones biológicas se han relacionado con distintos procesos fisiopatológicos entre los que destacan los estudios en cáncer<sup>108</sup>, enfermedades mediadas por el sistema inmune<sup>109</sup> y ECV<sup>110</sup>. Además, se ha demostrado que en condiciones tanto fisiológicas como patológicas estas EV pueden ser liberadas tras la activación, apoptosis o estrés celular<sup>111</sup>.

En la última década, el número de estudios en VEs se ha incrementado notablemente, cabe destacar el desarrollado por Lacroix y col<sup>112</sup> (2013) donde vieron que el incremento de MVs se asociaba directamente a un mayor riesgo cardiovascular y aquellos estudios que sugieren el empleo de EMVs como marcadores de disfunción endotelial ya que sus niveles aumentados se relacionan con varios factores de riesgo en el estudio Framingham<sup>113</sup> y con enfermedades que presentan una función endotelial alterada como en la aterosclerosis, estenosis de la válvula aórtica e hipertensión pulmonar<sup>114,115,116,117</sup>. En otro trabajo llevado a cabo en pacientes con hipertensión, se observó que pacientes con albuminuria presentaban un mayor incremento de MPs apoptóticas<sup>118</sup>.

El estudio de estas VEs en pacientes hipertensos con supresión del SRA podría aportar una valiosa fuente de información para la evaluación de la adecuada respuesta terapéutica identificando pacientes hipertensos con un elevado riesgo cardiovascular antes del desarrollo de la albuminuria.

## 5. MODELOS *IN VITRO*

Los estudios *in vitro* hacen referencia a las técnicas realizadas en células, tejidos u órganos fuera del organismo vivo que se pueden emplear para evaluar los efectos de factores implicados en un determinado proceso fisiopatológico. Los cultivos celulares se componen de un sistema formado por células que pueden provenir de un órgano o tejido, mantenidos en el tiempo en medios de cultivo de composición química definida, según la estirpe celular y en condiciones controladas de temperatura, pH y humedad<sup>119</sup>. El empleo de estos cultivos ha logrado grandes avances científicos en un gran número de líneas de investigación. Las principales ventajas de los modelos *in vitro* se deben a la posibilidad de utilizar material biológico humano, evitar interferencias de la respuesta del organismo, reducir el número de modelos animales, tener una gran versatilidad en el diseño experimental, ahorro de tiempo y coste económico<sup>120</sup>. El empleo de esos modelos para el estudio de una enfermedad proporciona una información valiosa que permite ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y progresión de una determinada patología.

### **Ensayo *in vitro* para el estudio de la disfunción endotelial**

En esta Tesis Doctoral se ha realizado un ensayo *in vitro* con el objetivo de estudiar dos proteínas alteradas en las VEs del plasma y su posible implicación en la disfunción endotelial. El endotelio vascular es el revestimiento interno de los vasos sanguíneos que actúa como órgano autocrino y paracrino y que regula la función de la pared vascular. Además, se ha demostrado que la disfunción endotelial es el paso inicial que ocurre durante el desarrollo del proceso aterosclerótico. Por tanto, la evaluación de los cambios en el endotelio podría ayudar en la identificación de pacientes hipertensos con mayor riesgo cardiovascular. Una de las metodologías más indicadas para estudiar los cambios que ocurren a nivel vascular sería mediante el análisis de las células endoteliales (CEs) a partir de su activación con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). El principal sitio de acción del TNF-  $\alpha$  es el endotelio vascular<sup>121</sup>, donde induce respuestas inflamatorias a través del incremento de la expresión de moléculas de adhesión y secreción de citoquinas<sup>122</sup> siendo, un potente agonista de la activación celular endotelial. La unión de la citoquina TNF- $\alpha$  a su receptor en las células endoteliales<sup>123</sup> produce una rápida translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B desde el citoplasma al núcleo<sup>124</sup>. Esta translocación conlleva a la transcripción de las moléculas de adhesión como E-



## *Introducción*

Selectina, ICAM-1 y VCAM-1, y las citoquinas IL-6 e IL-8<sup>125</sup>. La regulación de estos genes inicia la cascada inflamatoria: E-selectina media la interacción de leucocitos con el endotelio<sup>126</sup>, mientras que los leucocitos adherentes son activados por IL-8 unidos a ICAM-1 y otros ligandos de la superficie celular. Además, VCAM-1 se considera uno de los principales responsables de la atracción de las células mononucleares que desarrollan la lesión aterosclerótica<sup>127</sup>. La expresión coordinada de estas moléculas a través de las CEs activadas produce la adhesión de leucocitos seguida de su trans migración en los espacios tisulares<sup>128</sup>. Por ello, el análisis de la expresión de VCAM-1 y E-Selectina permitiría estudiar el papel de ambas proteínas en la activación de las CEs dentro de los vasos sanguíneos.

.

Hipótesis



## *Hipótesis*

Teniendo en cuenta la limitación que supone la falta de acceso a la mayoría de los órganos diana de la HTA, resulta necesario buscar muestras alternativas para la búsqueda de potenciales biomarcadores pronósticos y dianas tempranas de la patología. En este sentido existen numerosos datos en la bibliografía que señalan a la sangre como uno de los principales candidatos para realizar análisis proteómicos ya que pueden proporcionar una visión global de la respuesta del cuerpo humano ante esta enfermedad, y se obtiene de una forma poco invasiva. Presentes en este fluido biológico están las vesículas extracelulares (VEs) que se comportan como contenedores de potenciales biomarcadores de enfermedad al originarse en órganos concretos afectados, pudiendo considerarse como un sistema no-clásico de secreción de proteínas. Con todo esto en mente, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral planteamos un estudio de investigación traslacional utilizando múltiples abordajes proteómicos, algunos de los cuales no se han aplicado aún para esta patología, a partir de muestras de plasma y VEs circulantes del plasma. Además, la integración de los resultados mediante distintas herramientas bioinformáticas permitirá conseguir un mayor conocimiento acerca de los mecanismos moleculares implicados en el progreso de la enfermedad cardio-renal.

Nuestra hipótesis se basa en que la distinta respuesta farmacológica con inhibidores del SRA en pacientes hipertensos con distinto grado de afectación renal debería reflejarse en el proteoma del plasma y de las VEs circulantes del plasma. Por ello, es necesario llevar a cabo distintas estrategias experimentales que permitan obtener nuevos datos que aporten luz al proceso de resistencia a los fármacos antihipertensivos y al proceso de formación de albuminuria. Por un lado, el abordaje proteómico directo sobre las muestras de plasma y VEs mediante distintas estrategias proteómicas complementarias (2D-DIGE, iTRAQ, SRM) nos permitirá conocer el perfil proteómico de estos pacientes, así como la detección e identificación de posibles dianas terapéuticas o marcadores pronósticos que nos indiquen la posibilidad de desarrollar esta patología. Por otro lado, podremos valorar la evolución de la disfunción endotelial en estos mismos grupos de pacientes. La posible asociación de la albuminuria en hipertensión con un mayor grado de disfunción endotelial podría producir un aumento de los factores solubles y marcadores de daño endotelial. El empleo de las diferentes metodologías proteómicas en el estudio de la evolución del daño renal en pacientes hipertensos tratados con supresión del SRA aportará resultados de gran relevancia para un mayor conocimiento de esta patología.



# Objetivos



### OBJETIVO PRINCIPAL:

El objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral consiste en la identificación de potenciales marcadores tempranos que nos permitan identificar que pacientes hipertensos van a tener una respuesta ineficaz al tratamiento de supresión del SRA, así como también definir perfiles proteómicos característicos para llevar a cabo una clasificación eficiente de los pacientes en base al riesgo cardio-renal. La integración de los resultados obtenidos mediante las distintas herramientas bioinformáticas nos permitirán ampliar el conocimiento a nivel molecular sobre los mecanismos que puedan estar relacionados con el daño renal subyacente.

### OBJETIVOS PARTICULARES

Para este objetivo principal, planteamos los siguientes objetivos particulares:

1. Para saber qué pacientes hipertensos con distinto grado de afectación renal van a responder correctamente al tratamiento de supresión crónica del SRA:

1.1. Realizaremos el estudio de la expresión diferencial cuantitativa de las proteínas presentes en plasma deplecionado de pacientes normoalbuminúricos (N), pacientes que han desarrollado albuminuria *de novo* (dnA) y albuminuria mantenida (AM), mediante dos técnicas proteómicas complementarias (2D-DIGE y iTRAQ).

1.2. Cuantificar y confirmar las alteraciones proteicas observadas en ambos métodos descritos en el objetivo 1.1 en una cohorte independiente de pacientes, mediante técnicas ortogonales: monitorización de reacción seleccionada (SRM) y turbidimetría

2. Partiendo de la misma premisa que en el objetivo 1.2 y con el fin de estudiar la evolución de albuminuria en pacientes normoalbuminúricos en un periodo de dos años de seguimiento, realizaremos un estudio prospectivo donde trataremos de definir aquellas proteínas presentes en plasma con potencial valor predictor del desarrollo de albuminuria alta mediante turbidimetría.



## Objetivos

3. Como hemos visto en la introducción, diversos estudios señalan que los niveles de vesículas extracelulares (Ves) en plasma están asociados tanto con el riesgo cardiovascular como con el daño endotelial. Con esto en mente pretendemos:

3.1. Identificar las proteínas alteradas en las VEs circulantes de los grupos de pacientes descritos en el objetivo 1 como fuente de información sobre los mecanismos moleculares que tienen lugar en las células endoteliales (CEs) de los vasos sanguíneos y su utilidad como indicadores de riesgo cardiovascular. Estudio de la expresión diferencial cuantitativa mediante iTRAQ.

3.2. Cuantificar y confirmar las alteraciones proteicas observadas en VEs del plasma mediante SRM en una cohorte independiente de pacientes.

3.3. Estudiar *in vitro* de la expresión de aquellas proteínas de interés encontradas diferencialmente expresadas en VEs del plasma de pacientes hipertensos con albuminuria alta sobre CEs y su posible implicación en la disfunción endotelial.

## *Objetivos*

# Material y Métodos

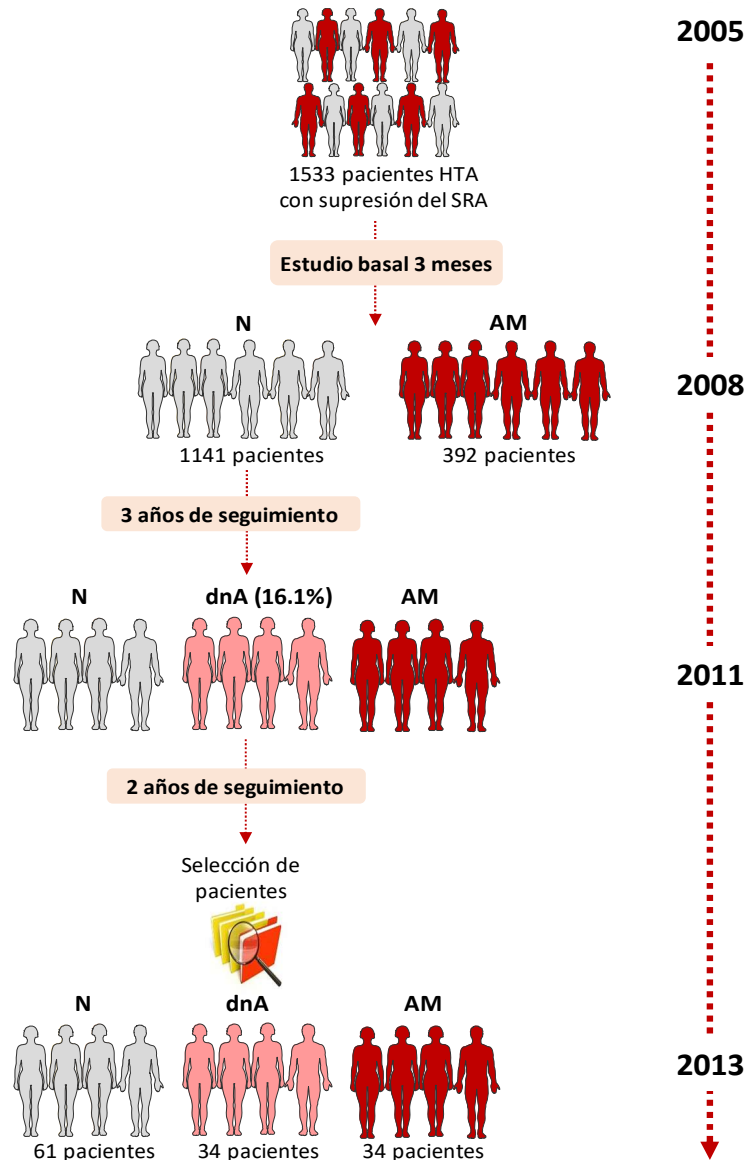


## 1. SELECCIÓN DE PACIENTES

La clasificación y selección de pacientes, procedentes de la Unidad de Hipertensión del 12 de Octubre se basó en un trabajo publicado previamente en el que se estudió el desarrollo de albuminuria *de novo* en individuos hipertensos bajo supresión crónica del SRA<sup>129</sup>. En este estudio, se analizaron 1533 pacientes de dicha Unidad previamente tratados con i-SRA (IECA o ARB) a dosis adecuadas durante un periodo de cinco años. En una primera fase de tres meses de duración se registraron los datos basales donde se controlaron cuidadosamente los factores de riesgo cardiovascular y, además se les incrementó la dosis de los fármacos hasta tolerancia máxima. Al inicio de este estudio, de los 1533 pacientes, 1141 (72.7%) eran normoalbuminúricos mientras que los restantes 392 (27,3%) presentaban albuminuria resistente. El seguimiento de los sujetos incluidos en el estudio se realizó durante un periodo de tres años con visitas a la Unidad cada seis meses para controlar la evolución de albuminuria, es muy importante el señalar que la supresión del SRA se mantuvo a lo largo de todo el proceso. Una vez finalizado el estudio se observó que el 16.1% de los pacientes normoalbuminúricos habían desarrollaron albuminuria *de novo*, definiéndose la albuminuria *de novo* como la aparición de albuminuria alta (ACR de 20 a 200 mg/g en hombres y 30 a 300 mg/g en mujeres) o albuminuria muy alta (> 200 mg/g en hombres y > 300 mg/g en mujeres). Para confirmar estos datos, se realizó una segunda determinación de ACR en los 3 semestres posteriores con tres medidas diferentes de las muestras de orina tomadas a primera hora de la mañana. Estos pacientes, junto con los que presentaban albuminuria muy alta, fueron tratados con la mayor dosis posible de IECA o ARA, junto con la administración de un diurético o antagonistas de calcio en aquellos casos necesarios y, en pacientes cuya PA estaba por encima de 140/90 mmHg se combinaron hasta tres fármacos distintos. Tras finalizar el último año de seguimiento, se seleccionó una cohorte representativa de 129 pacientes hipertensos (49 individuos con diabetes mellitus tipo 2 y 81 no diabéticos) que fueron reclutados durante el periodo comprendido entre enero del 2012 y junio del 2013 (Figura 8). En este grupo de individuos quedaron excluidos los casos con presencia de formas secundarias de hipertensión y enfermedades renales.

Estos pacientes se clasificaron en tres grupos atendiendo a la evolución de albuminuria:

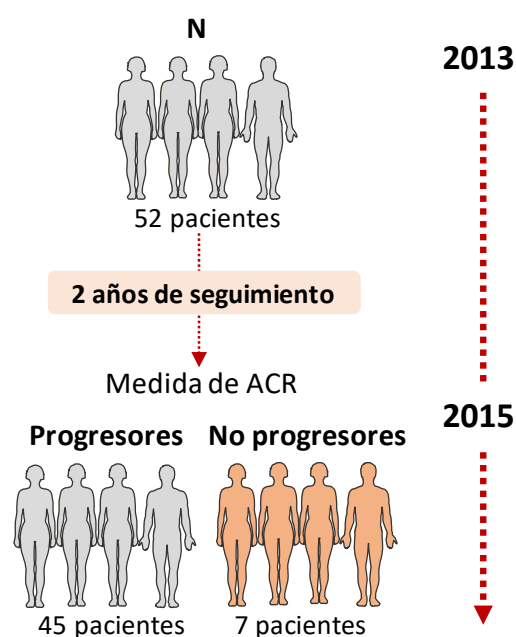
- Normoalbuminuria (N): pacientes que presentaron valores normales de albúmina en orina durante los tres años del seguimiento.
- Albuminuria *de novo* (dnA): pacientes que desarrollaron albuminuria durante el seguimiento.
- Albuminuria mantenida (AM): pacientes que presentaron albuminuria durante todo el seguimiento.



**Figura 8. Representación esquemática de la evolución del estudio que se realizó en 1533 pacientes hipertensos con supresión crónica del SRA.** Este estudio incluye un seguimiento basal inicial durante 3 meses para controlar los factores de riesgo cardiovasculares y después, un seguimiento durante 3 años con visitas a la Unidad cada 6 meses. Una vez finalizado este periodo, se clasificaron los pacientes y se llevó a cabo la recogida de muestras. SRA: Sistema Renina-Angiotensina; N: normoalbuminuria; AM: albuminuria mantenida; dnA: albuminuria *de novo*.

Además, se realizó un estudio prospectivo de la evolución de albuminuria en pacientes con normoalbuminuria tras dos años de seguimiento (Figura 9), clasificándolos en dos grupos distintos en función del cambio en los niveles de albúmina en orina:

- Progresores: pacientes que progresaron a mayores niveles de albúmina en orina y que definimos en base al incremento de ACR mayor de 10 mg en hombres y 15 mg en mujeres.
- No progresores: pacientes que no mostraron una progresión en los niveles de albúmina.



**Figura 9. Representación esquemática del estudio prospectivo que se realizó en individuos normoalbuminúricos durante un periodo de 2 años.** Tras este periodo, los pacientes se clasificaron como progresores o no progresores a mayores niveles de albuminuria atendiendo al cambio en ACR en orina mayor de 10 mg en hombres y 15 mg en mujeres. N: normoalbuminuria; ACR: relación albúmina-creatinina.

## 2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

En este trabajo, se utilizaron muestras de sangre de la cohorte de 129 pacientes hipertensos con supresión crónica del SRA tal y como hemos descrito previamente. El estudio se realizó siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y con la aprobación del comité ético del Hospital Universitario 12 de Octubre. Todos los participantes incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado antes de su inclusión en el. Las muestras de sangre se recogieron a primera hora de la mañana en tubos estériles de citrato sódico y se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio

de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM (Toledo) en un intervalo inferior a 3 horas e inmediatamente procesadas para evitar el deterioro de la muestra. El número de muestras pertenecientes a cada grupo de estudio, así como sus características basales y medicación quedan detallados en la sección de resultados.

Además, para los análisis *in vitro* se utilizó un trozo pequeño de vena safena humana de adulto (7 cm x 3 mm), recogida de una intervención quirúrgica de revascularización en el Hospital Virgen de la Salud, Toledo. La muestra se procesó en un periodo inferior a 4 horas y se almacenó en una solución de PBS.

## **2.1. PLASMA**

Para llevar a cabo la obtención del plasma, las muestras se centrifugaron a 1500g (5810R, Eppendorf) durante 10 min. a 20°C y seguidamente se almacenó en alícuotas de 500 µl a -80°C hasta su empleo.

## **2.2. AISLAMIENTO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DEL PLASMA**

En el caso del aislamiento de las VEs, el primer paso necesario consistió en la obtención del plasma libre de plaquetas con el fin de no contaminar la muestra. Para ello, se realizaron 2 centrifugaciones sucesivas: 1) 1500 g durante 25 min. y 2) 15000 g, 2 min. Seguidamente, para eliminar las proteínas del plasma, se realizaron 3 ultracentrifugaciones consecutivas en una ultracentrífuga Óptima L-100 XP (Beckman Coulter) a 250000 g y con un rotor SW41 utilizando diferentes tampones y tiempos en cada una de los pasos: 1) HEPES durante 5 horas, 2) KBr 250 mM, 15 horas y 3) tampón fosfato salino (PBS) durante 4 horas. Todos estos pasos se realizaron en presencia de citrato sódico 10 mM para prevenir la agregación de las EVs.

## **3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MORFOLÓGICA DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Para obtener una descripción complementaria de la morfología, tamaño y marcadores de su origen celular se realizó la caracterización de las VEs. Las técnicas que llevamos a cabo para confirmar el fenotipo de las VEs son las que se detallan a continuación.



### 3.1. EVALUACIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE EN LAS VEs POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para estudiar los marcadores de superficie de las VEs, tanto de origen plaquetario como endotelial se utilizaron dos anticuerpos monoclonales frente a:

- CD61 combinado con el fluorocromo ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*) (BD Biosciences), para identificar las VEs derivadas de las plaquetas, la fuente más abundante de VEs en la sangre.
- CD31 conjugado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Fluorescein IsoTioCyanate*) (BD Biosciences) para identificar aquellas que provienen de células endoteliales.

Además, se utilizó como control negativo una mezcla de anticuerpos isotípicos, uno de ellos conjugado con PE (IgG-PE) (eBioscience) y el otro conjugado con FITC (IgG-FITC) (BD Biosciences). Se prepararon alícuotas de 50 µl de VEs en PBS de cada muestra de plasma y una alícuota de 50 µl con un mancomunado de todas las muestras a analizar que se utilizó como control negativo y marcó con la mezcla de isotípicos. Se añadió 50 µl de tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino (BSA) 2%, suero normal de cabra (GNS) 2% en PBS-Citrato 20 mM) a cada tubo y se incubó en hielo durante 20 min. Después se añadió a cada muestra 5 µl de un reactivo de bloqueo FcR (Miltenyi Biotec) y se incubaron durante 10 min. en hielo. Este paso es muy recomendable por las casas comerciales para incrementar la especificidad de la tinción inmunofluorescente con los anticuerpos y evitar la aparición de uniones inespecíficas. Posteriormente, para realizar el marcaje de las muestras se añadió a cada una 5 µl del anticuerpo conjugado con PE contra CD61 (dilución 1:20) y 2 µl de anticuerpo conjugado con FITC contra CD31 (dilución 1:50). En el caso de la alícuota que se utilizó como control negativo, se añadió 1.25 µl de IgG-PE (dilución 1:80) y 0.5 µl de IgG-FITC (dilución 1:80). Se incubaron las muestras durante al menos 30 min. en hielo y en oscuridad. Una vez finalizado el marcaje, se diluyeron las muestras a una proporción 1:1 con PBS-Citrato 20 mM, se agitaron vigorosamente y se realizó un pulso corto de centrifuga para bajar todo el volumen. Las muestras de las VEs se analizaron por citometría de flujo en un equipo FACS CANTO II (BD Biosciences), en la Unidad de Citometría del Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo. Debido al pequeño tamaño de estas VEs y su dificultad para identificarlas en el equipo, se emplearon unas partículas fluorescentes calibradas de diferentes tamaños (0.16 µm, 0.20 µm, 0.24 µm y 0.5 µm) (*MegaMix SSC*

*Plus beads*, Biocytex) que permitieron definir una ventana patrón donde identificar estas VEs. La adquisición de los datos, así como los análisis se realizaron con el programa *FlowJo* versión 9.3.2 (Tree Star).

### **3.2. VISUALIZACIÓN DE LAS VEs DE ORIGEN PLAQUETARIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL**

Para llevar a cabo la visualización de las VEs de origen plaquetario, se prepararon dos alícuotas de 50 µl de VEs en PBS y se resuspendieron en formaldehído (FA) 4%. Seguidamente las muestras se colocaron en cubreobjetos circulares y se dejaron secar al aire libre. Se bloquearon con BSA 5% y se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo frente a CD61 combinado con PE (1:20) o con un anticuerpo control del mismo isotipo IgG-PE (1:80). Pasado ese tiempo, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se realizó un último lavado con agua bidestilada. Finalmente, las muestras se montaron en un portaobjetos con Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich).

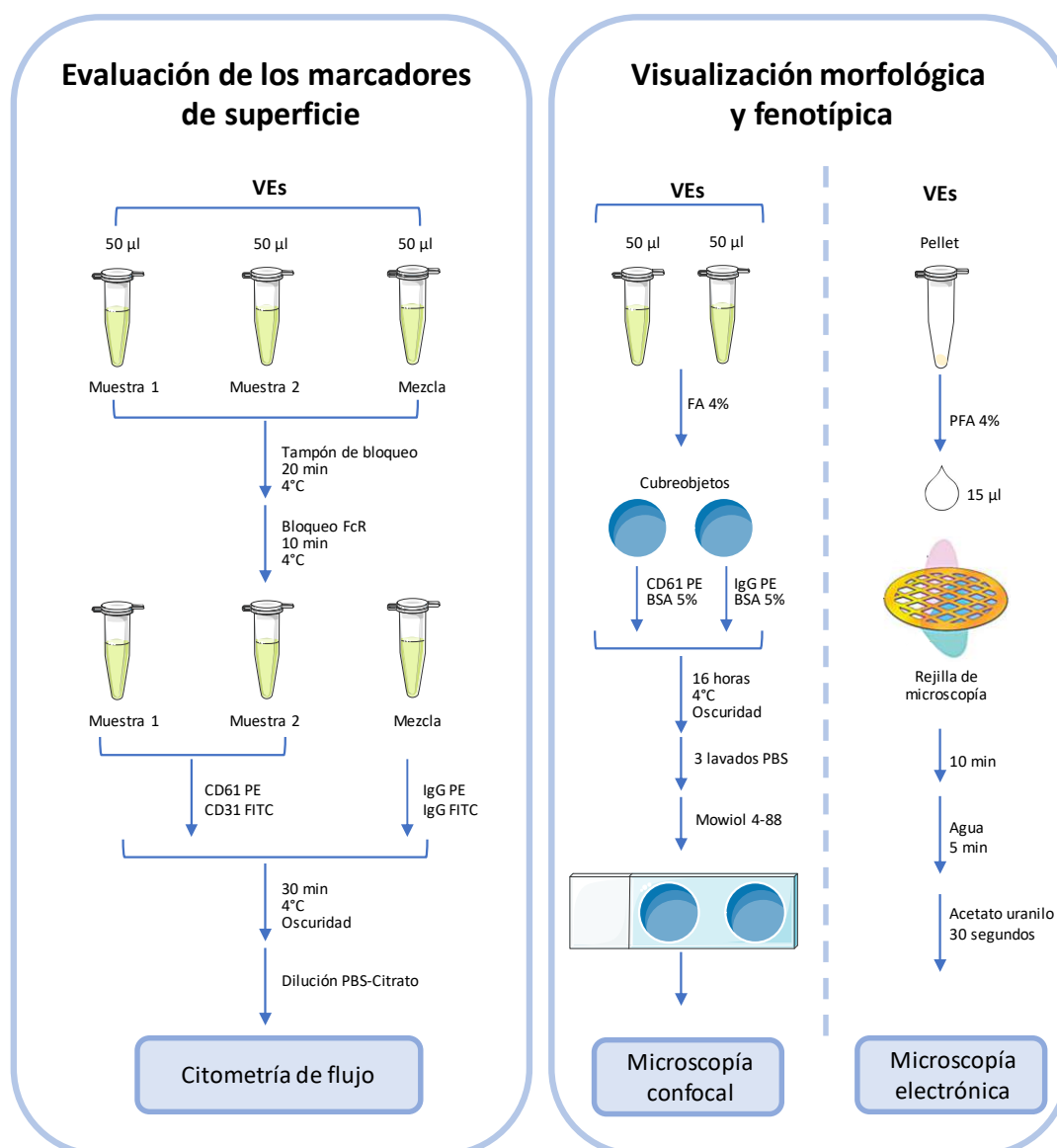
Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas con un microscopio confocal TCS SP5 (Leica), en el servicio de Microscopía, del Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo.

### **3.3. VISUALIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS VEs MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Con el objetivo de determinar el tamaño y morfología de estas VEs, las muestras se analizaron mediante microscopia electrónica. Para ello, el precipitado obtenido de la ultracentrifugación se resuspendió en 1 ml de paraformaldehído (PFA) 4% en PBS. Una gota de muestra (correspondiente a 15 µl) se depositó sobre una lámina de parafilm (Pechiney Plastic Packaging Company) y se colocó en una rejilla de microscopía electrónica recubierta de Formvar/Carbón (Ted Pella) durante 10 min. Después se situó la rejilla en agua bidestilada durante 5 min. y, por último, y con el fin de conseguir un contraste adecuado que permitiera visualizar las muestras correctamente, se realizó una tinción negativa colocando la rejilla en 20 µl de acetato de uranilo 2% en agua bidestilada durante 30 segundos.

La preparación se observó en un microscopio de transmisión JEM 1010 (JEOL), lo que permitió visualizar las imágenes con la presencia de VEs.

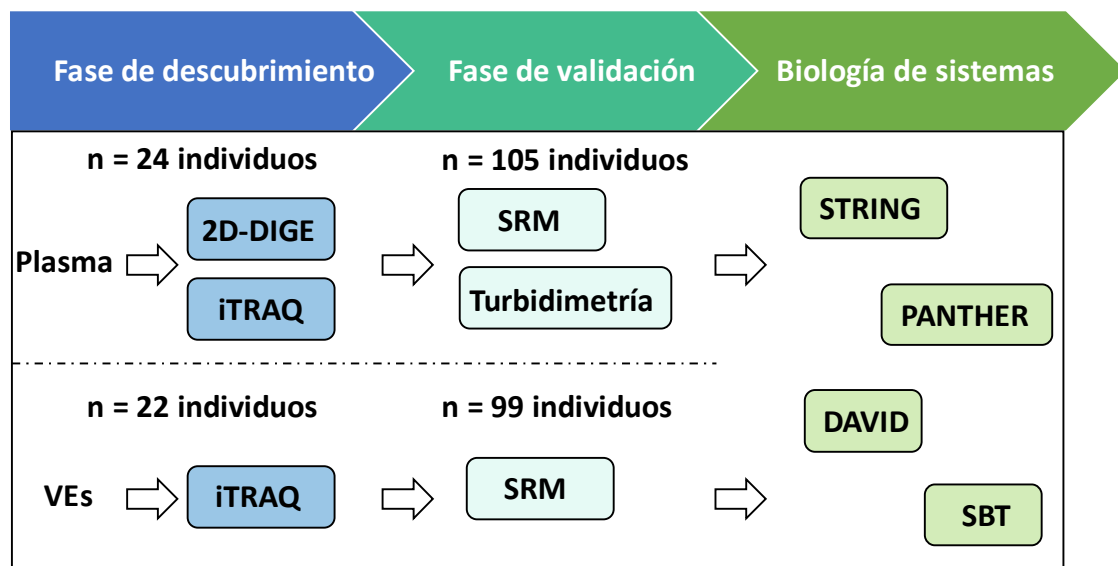
En la Figura 10 queda resumida la metodología empleada para la caracterización fenotípica y morfología de las VEs.



**Figura 10.** Esquema representativo de las técnicas utilizadas para llevar a cabo la caracterización fenotípica y morfológica de las VEs del plasma mediante citometría de flujo, microscopía confocal y electrónica. FA: formaldehído; PFA: paraformaldehído.

#### 4. ABORDAJE MULTI-PROTEÓMICO APLICADO AL ESTUDIO DE LA ALBUMINURIA EN PACIENTES HIPERTENSOS CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA

En esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo un abordaje multi-proteómico para estudiar la evolución de la albuminuria tanto en plasma como en VEs de plasma de pacientes hipertensos con supresión de SRA (Figura 11). En cuanto al plasma, se realizó un análisis diferencial mediante dos técnicas complementarias: 2D-DIGE e iTRAQ en un conjunto de 24 pacientes. Posteriormente, se confirmaron las proteínas diferencialmente expresadas mediante las técnicas SRM y turbidimetría en una cohorte independiente de 105 pacientes. Además, se realizó un estudio prospectivo de dos años en 52 pacientes con normoalbuminuria en el que se analizaron 3 proteínas diferencialmente expresadas mediante turbidimetría. Por otro lado, se llevó a cabo un protocolo de aislamiento de las VEs del plasma y caracterización de dichas vesículas mediante citometría de flujo, microscopía confocal y electrónica. Después, se realizó un análisis diferencial mediante iTRAQ en 22 pacientes y una posterior fase de confirmación de dos de las proteínas alteradas mediante SRM en una cohorte diferente de 99 pacientes.



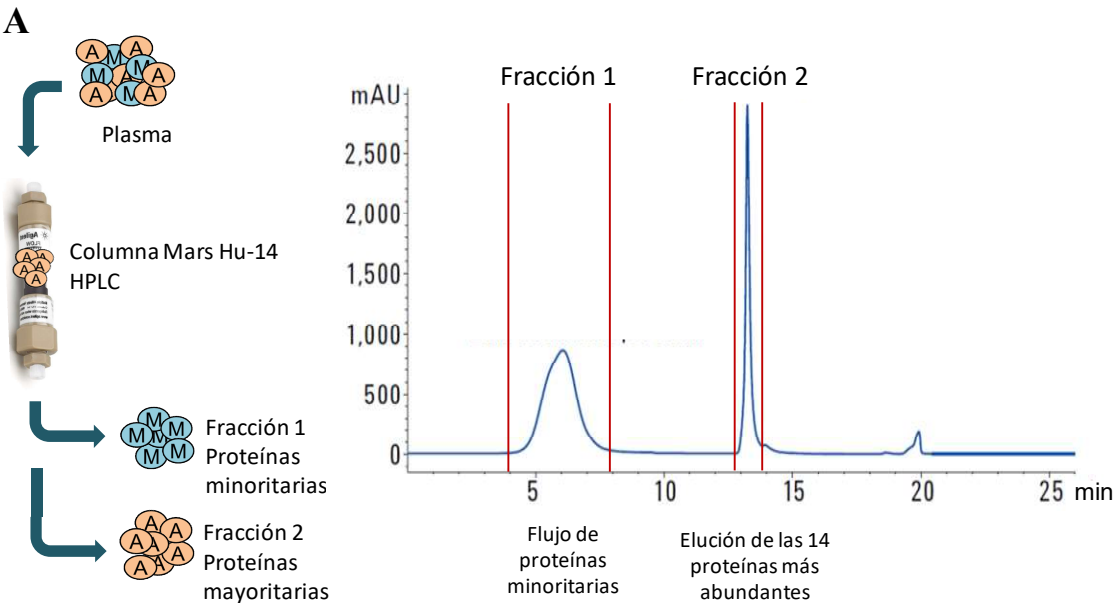
**Figura 11. Flujo de trabajo general realizado para el estudio de la albuminuria tanto en plasma como en VEs del plasma.** En el esquema se representan las distintas metodologías empleadas en cada una de las fases del estudio, descubrimiento y validación, así como también las distintas herramientas informáticas utilizadas para el análisis de la biología de sistemas.

## 4.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DEL PLASMA

Para la realización de los estudios proteómicos en plasma, se llevó cabo un paso de fraccionamiento de la muestra con el fin de reducir el rango dinámico de concentración mediante la inmunodepleción de proteínas abundantes lo que da lugar al enriquecimiento de proteínas que se encuentran en menor concentración. Seguidamente, se realizaron los intercambios de tampón de las muestras, la determinación de la concentración de proteína y un paso de limpieza.

### 4.1.1. Inmunodepleción de las proteínas mayoritarias del plasma

La depleción de las proteínas más abundantes del plasma se llevó a cabo utilizando el sistema MARS (*Múltiple Affinity Removal System*, Agilent Technologies) utilizando un cromatógrafo HPLC 1200 series (Agilent Technologies). Este sistema está basado en una columna de afinidad MARS Hu-14, 4,6mm x 50mm (Agilent Technologies) que contiene anticuerpos policlonales capaces de retener las catorce proteínas más abundantes del plasma (albúmina, IgG,  $\alpha$ 1-antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina, fibrinógeno,  $\alpha$ 2-macroglobulina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, Apo AI, Apo AII, Ig M, transtiretina y complemento C3) que constituyen el 94% del contenido proteico total<sup>130</sup>. Se utilizó el protocolo recomendado por la casa comercial, que incluía dos tampones especiales (tampón A y tampón B) (Agilent Technologies) optimizados para asegurar la reproducibilidad y prolongar la vida de la columna. El tampón A es un tampón fosfato de pH neutro que se utiliza para inyectar la muestra en el sistema, equilibrar y lavar la columna, mientras que el tampón B contiene urea y está a pH ácido, indicado para facilitar la elución de las proteínas mayoritarias retenidas por la columna. Para cada inyección de la muestra en el equipo, se hicieron diluciones 1:4 del plasma (20  $\mu$ l de plasma con 60  $\mu$ l de tampón A) y se centrifugaron a 14000 g durante 1 min. a través de tubos con filtros de acetato de celulosa de 0.22  $\mu$ m (*Spin-X 8160*, Costar) para poder eliminar las partículas que pudiesen obstruir la columna o los capilares del sistema. Se realizaron 5 ciclos cromatográficos por muestra según las indicaciones de la casa comercial y una vez finalizadas las carreras, se recogieron las fracciones que contienen las proteínas no retenidas (minoritarias) en tubos concentradores con filtros de 3 KDa (*Centrifugal Filter Amicon Ultra, Ultracel 3K*, Millipore). A continuación, se centrifugaron a 3000g durante 35 min. en un rotor basculante (5108R, Eppendorf) (Figura 12).



**B**

Pasos	Tiempo (min)	% Tampón A	% Tampón B	Flujo (ml/min)
1	0.00	100	0	0.125
2	9.50	100	0	0.125
3	9.51	100	0	1.000
4	11.50	100	0	1.000
5	11.51	0	100	1.000
6	16.00	0	100	1.000
7	16.01	100	0	1.000
8	25.0	100	0	1.000

**Figura 12. Inmunodepleción de las proteínas mayoritarias del plasma. A)** Esquema representativo del proceso de la depleción mediante cromatografía de afinidad. **B)** Tabla donde se muestran los distintos pasos cromatográficos empleados en cada ciclo, así como el porcentaje de tampón A o B y el flujo aplicado.

#### 4.1.2. Intercambio de solución y cuantificación

Para eliminar los restos de tampón A y realizar el cambio a otra solución compatible con los análisis proteómicos, se realizaron 3 lavados con un tampón de bicarbonato amónico (AMBIC) 65 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM y ácido etidiaminotetraacético (EDTA) 0.5 mM. Para ello, se añadió 3.5 ml de tampón en los tubos concentradores y se concentró por centrifugación hasta dejar un volumen de 500 µl de muestra. Una vez realizado el último lavado, las muestras quedaron concentradas en un volumen aproximado de 200-250 µl y se dializaron frente a Tris 20 mM durante 12 horas utilizando unos tubos comerciales con una membrana de 1 KDa de tamaño de poro (*Mini Dialysis Kit*, GE Healthcare).

Una vez las muestras quedaron concentradas y equilibradas en el tampón correspondiente, se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford-Lowry (Bio-Rad)<sup>131</sup> y se guardaron en unos eppendorf de 1.5 ml a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### **4.1.3. Limpieza de la muestra**

Antes de iniciar los análisis proteómicos diferenciales tanto por 2D-DIGE como iTRAQ, se realizó un proceso de limpieza de las muestras utilizando el kit comercial 2D *Clean-Up* (GE Healthcare) para eliminar las posibles impurezas que puedan interferir en dicho análisis. Para ello, se preparó un volumen de muestra con una cantidad de proteína máxima de 100 µg y se le añadió 300 µl de una solución precipitante que se incubó en hielo durante 15 min. Seguidamente, se añadió 300 µl de una solución co-precipitante, se agitó vigorosamente la mezcla y se centrifugó a 21000g (5810R, Eppendorf) durante 10 min. Tras este paso, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se volvió a centrifugar de nuevo con un pulso breve para eliminar el líquido residual. Posteriormente, se añadió 40 µl de co-precipitante y se repitió el paso de centrifugación. Una vez eliminado el sobrenadante, se añadió sobre el precipitado de proteínas 20 µl de agua estéril y se agitó durante 10-20 segundos. Para precipitar la muestra, se añadió 1 ml de tampón de lavado almacenado previamente a -20°C y 5 µl de aditivo de lavado. La mezcla se incubó durante 1 hora a -20°C agitando cada 15 min. Una vez finalizado ese tiempo, se centrifugaron las muestras a 14000g (5810R, Eppendorf) durante 10 min. y se eliminó el sobrenadante por completo. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente no más de 5 min. y se resuspendió en un tampón adecuado para los posteriores análisis proteómicos.

### **4.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DIFERENCIAL EN GEL (2D-DIGE)**

#### **4.2.1. Marcaje de las muestras**

Los precipitados de proteínas obtenidos tras el paso de limpieza se resuspendieron en un tampón de marcaje (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% y tris 30 mM) a pH 8.5 para obtener una concentración de 7mg/ml. Antes de proceder con el marcaje, se preparó un estándar interno compuesto por una mezcla de todas las muestras que componían el estudio. Para ello, se añadió en un único tubo el volumen correspondiente a 50 µg de

proteína del estándar interno por cada gel y 50 µg de proteína de cada pool, compuesto de dos pacientes del mismo grupo. El marcaje de las muestras con los fluorocromos del kit comercial DIGE *fluor minimal dyes* (GE Healthcare) se realizó siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Para ello, las muestras de los distintos grupos experimentales se marcaron alternativamente con 1 µl del fluorocromo correspondiente (Cy3 y Cy5) según el diseño experimental de la Tabla 2, mientras que el estándar interno se marcó con el fluorocromo Cy2. Para que sea efectiva la reacción de marcaje, las muestras se incubaron en hielo durante 30 min. en oscuridad y pasado ese tiempo se detuvo la reacción añadiendo 1 µl de lisina 10 mM por cada 50 µg de muestra incubando de nuevo en hielo 10 min. en oscuridad.

Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	Estándar Interno	C-1	N-1
2	Estándar Interno	dnA-1	C-2
3	Estándar Interno	N-2	AM-1
4	Estándar Interno	AM-3	dnA-2
5	Estándar Interno	C-3	AM-2
6	Estándar Interno	AM-4	N-3
7	Estándar Interno	dnA-4	C-4
8	Estándar Interno	N-4	dnA-3

**Tabla 2. Diseño experimental del estudio proteómico comparativo del plasma mediante 2D-DIGE.**  
C: control; N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

## 4.2.2. Electroforesis bidimensional (2-DE)

### 4.2.2.1. Primera dimensión: Isoelectroenfoque

A cada mezcla marcada, se le añadió el tampón de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M y CHAPS 4%) con ditiotretitol (DTT) 40 mM y anfolitos pH 3-10 1% (GE Healthcare) hasta alcanzar un volumen final de 450 µl. Para llevar a cabo el IEF, se rehidrataron las tiras IPG de 24 cm de longitud de rango lineal de pH 4-7 durante toda la noche. Tras la rehidratación pasiva, se sometieron las tiras en una bandeja de cerámica (*“Ettan IPGphor Manifold Ceramic Tray”*, GE Healthcare) y se cubrieron con aceite mineral (Bio-Rad) para evitar que se secasen durante el proceso de enfoque eléctrico. Esta bandeja se introdujo en una unidad Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) utilizando el siguiente programa: 30 min a 500 V, 3 horas hasta 3500 V (en gradiente), 3 horas a 3500 V, 3 horas en gradiente a 6000V y desde 6000V hasta 69000 V/h totales.



#### 4.2.2.2. Equilibrado

Una vez terminado el IEF, las tiras se incubaron en un tampón equilibrado (tris-HCl 1.5 M pH 8.8, urea 6 M, glicerol 87%, dodecilsulfato sódico (SDS) 2% y trazas de azul de bromofenol). Este proceso se realizó en dos pasos sucesivos de 20 min. cada uno en agitación y a temperatura ambiente. En la primera incubación se añadió al tampón de equilibrado un 1% de DTT con el fin de reducir los grupos tiol de las proteínas desnaturalizadas y en la segunda incubación se añadió al tampón un 2.5% de iodoacetamida (IAA) para llevar a cabo la alquilación de los mismos grupos reducidos en el paso anterior y evitar su re-oxidación.

#### 4.2.2.3. Segunda dimensión: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

La segunda dimensión se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Laemmli<sup>132</sup> con algunas modificaciones utilizando el sistema de electroforesis Ettan DALTsix (GE Healthcare) para llevar a cabo la polimerización de hasta seis geles simultáneamente. Para ello se emplearon geles de 24 x 20 cm al 10% de acrilamida en presencia de SDS. Para la elaboración de los geles se prepararon soluciones a partir de una disolución concentrada de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) y agua bidestilada. A esta mezcla se le añadió tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 10% para obtener la concentración deseada en cada caso. Por último, se añadieron persulfato amónico (APS) 10% y N,N,N',N'-51 tetrametiletilendiamina (TEMED) como catalizadores de la reacción de polimerización. Una vez polimerizados los geles, las tiras IPGs se colocaron directamente en contacto con la región superior de éstos, evitando que quedaran burbujas entre la tira y la superficie del gel. La electroforesis tuvo lugar a una temperatura de 25°C a un voltaje de 0.75 W/gel durante toda la noche en una solución de electroforesis compuesta por tris 30 mM, glicina 0.2 M y SDS 0,1%.

#### 4.2.3. Digitalización y análisis de las imágenes

Una vez finalizada la segunda dimensión, los geles fueron digitalizados empleando un escáner de fluorescencia *Typhoon 9400 Variable Mode Imager* (GE Healthcare), que permitió adquirir las imágenes emitidas de cada fluorocromo por separado aplicando las longitudes de onda de excitación y emisión específicas de cada fluorocromo. Después, las imágenes se analizaron mediante el programa *Dcyder Differential Analysis*

*Software* (GE Healthcare), versión 7.0). Este programa informático está compuesto de varios módulos:

- Análisis diferencial en gel (DIA, *Differential In-gel Analysis*): permite detectar y cuantificar las manchas proteicas de las 3 imágenes (Cy2, Cy3 y Cy5) correspondientes a cada gel. La cuantificación de las manchas proteicas se calcula en base a una relación de la muestra/estándar interno: Cy3/Cy2 y Cy5/Cy2, lo que permite tener un valor de intensidad de fluorescencia normalizado para cada mancha.
- Análisis de variación biológica (BVA, *Biological Variation Analysis*): en este módulo se realiza el emparejamiento de las manchas detectadas entre las imágenes de los diferentes geles para después realizar el análisis estadístico sobre los niveles de expresión de las manchas en los diferentes grupos del experimento.
- Análisis de expresión diferencial (EDA, *Extended Data Analysis*): permite realizar análisis estadísticos más complejos como el análisis de componentes principales (ACP) en base a las manchas proteicas diferenciales entre los grupos de estudio. De este modo, obtenemos una perspectiva general simplificada del conjunto de los datos obtenidos, así como también, permite encontrar los valores extremos o atípicos dentro de los mismos.

#### **4.2.4. Tinción de los geles y escisión de las manchas proteicas**

Una vez terminada la digitalización de los geles 2D-DIGE, se realizó la tinción de los mismos para poder llevar a cabo la escisión de manchas proteicas diferencialmente expresadas entre los distintos grupos del estudio y su posterior identificación por MS. Además, en algunos casos, para conseguir una mejor visualización e identificación de las manchas proteicas de menor tamaño se realizó un gel 2-DE con mayor cantidad de proteína, siguiendo el protocolo descrito en el apartado “4.2.2. Electroforesis bidimensional (2-DE)”.

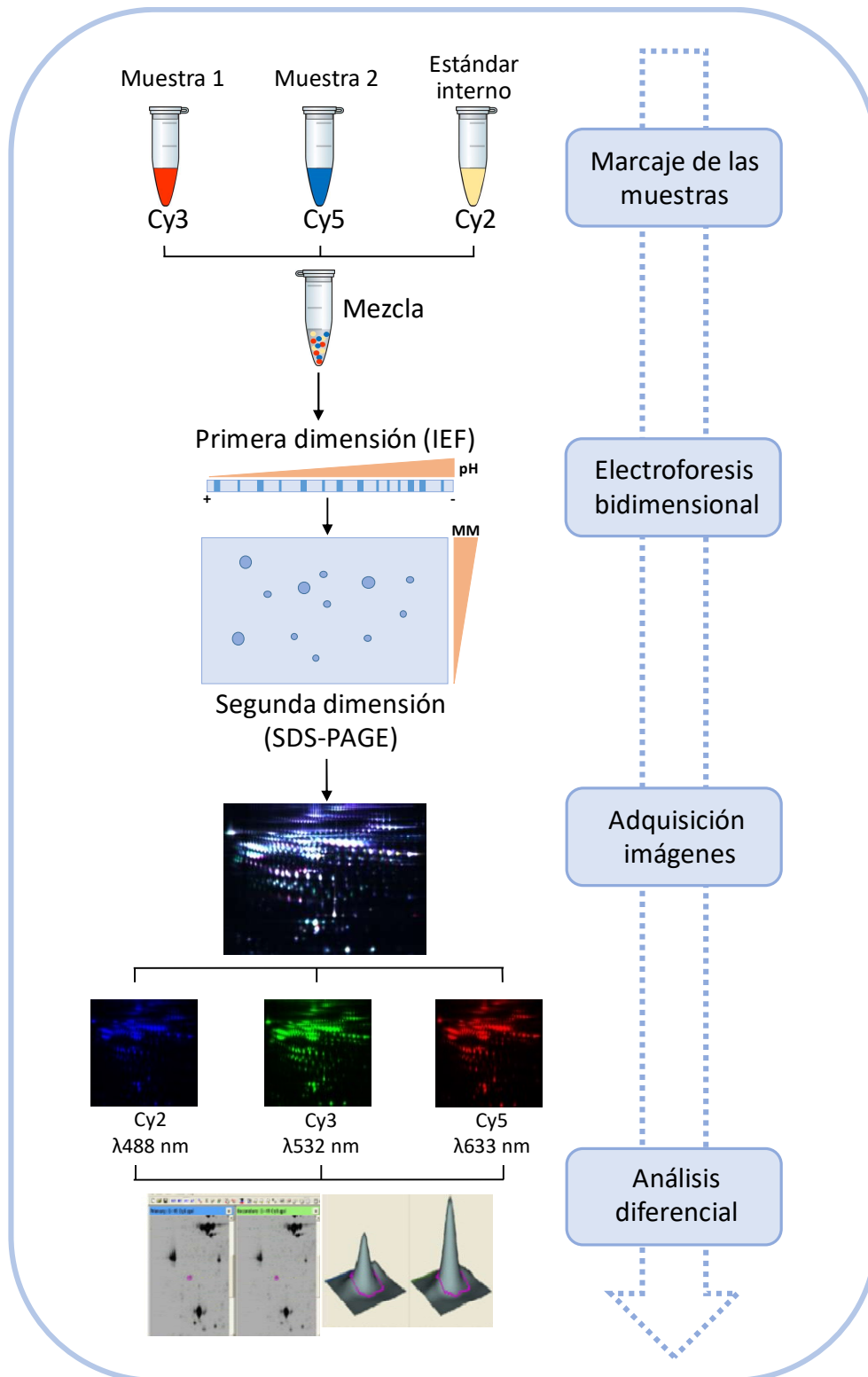
##### **4.2.4.1. Tinción fluorescente**

La tinción fluorescente se realizó con *Oriole<sup>TM</sup>* (Bio-Rad). Este protocolo de tinción rápido y sencillo constó únicamente de un paso de incubación de 90 min. La visualización y posterior escisión de las manchas proteicas de interés se realizó en un escáner de fluorescencia *EXQuest Spot Cutter* (Bio-Rad).

#### 4.2.4.2. Tinción de plata

En este caso, se empleó el kit comercial *Silver Staining Protein* (GE Healthcare) basado en el método de Heukeshoven y Dernick<sup>133</sup> para la tinción de los geles. En cada una de las etapas de este proceso de tinción, los geles se sumergieron en 250 ml/gel de la correspondiente solución y se mantuvieron en agitación y a temperatura ambiente durante todo el proceso. Una vez terminada la electroforesis, los geles se introdujeron en una solución de fijación (etanol 30% y ácido acético 5%) durante 30 min. Después, se realizaron tres lavados de 10 min. cada uno en agua bidestilada para posteriormente añadir la solución de sensibilización (etanol 30%, tiosulfato sódico 5% y acetato sódico 6.8%) durante 30 min. De nuevo, se realizaron otros tres lavados con agua bidestilada de 10 min cada uno. Seguidamente, los geles se sumergieron en una solución de nitrato de plata 2.5% durante 10 min. y, tras dos lavados de 1 min. cada uno con agua bidestilada, se incubaron los geles con una solución de desarrollo (carbonato sódico 2.5% y FA 37%), añadido justo antes de usarlo. Una vez finalizado el revelado, se detuvo la reacción sumergiendo los geles en una solución de parada (EDTA- $\text{Na}_2$  1.46%) durante 10 min. Los geles se digitalizaron en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad) y posteriormente se almacenaron en recipientes con agua bidestilada a 4°C hasta la escisión de manchas proteicas.

El esquema general de la metodología 2D-DIGE se encuentra representado en la Figura 13.



**Figura 13. Figura representativa de la metodología empleada en el análisis proteómico 2D-DIGE.** Las proteínas de las diversas muestras son marcadas con los distintos fluorocromos y seguidamente se mezclan para separar las proteínas en función de su punto isoelectrico y masa molecular. Después, las imágenes de los gels son captadas mediante un escáner de fluorescencia y se realiza la cuantificación de las manchas proteicas y el posterior análisis diferencial entre los distintos grupos del estudio. IEF: isoelectroenfoco; MM: masa molecular.

### 4.3. iTRAQ

Los análisis de marcaje isobárico diferencial (iTRAQ, 8-plex) se realizaron en colaboración con la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

#### 4.3.1. Preparación de las muestras

##### 4.3.1.1. Plasma

150 µg de proteína total de cada *pool*, formado por dos individuos del mismo grupo, se precipitaron con acetona y se resuspendieron en una solución de tris 50 mM, SDS 4%, DTT 50 mM ajustado a pH 8.

##### 4.3.1.2. VEs del plasma

El precipitado de las VEs aisladas se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, SDS 1%, DTT 1%). Seguidamente, se sonicaron las muestras en dos pasos de 2 min. con un paso intermedio en hielo. Después, se centrifugaron a 15000g durante 5 min. para eliminar restos de membrana. El sobrenadante se cuantificó mediante el método de Bradford-Lowry. Una alícuota de 150 µg de proteína se precipitó con acetona fría para limpiar la muestra y se resuspendió en una solución que contenía tris 50 mM, SDS 4%, DTT 50 mM a pH 8.8.

#### 4.3.2. Digestión de las muestras y marcaje iTRAQ

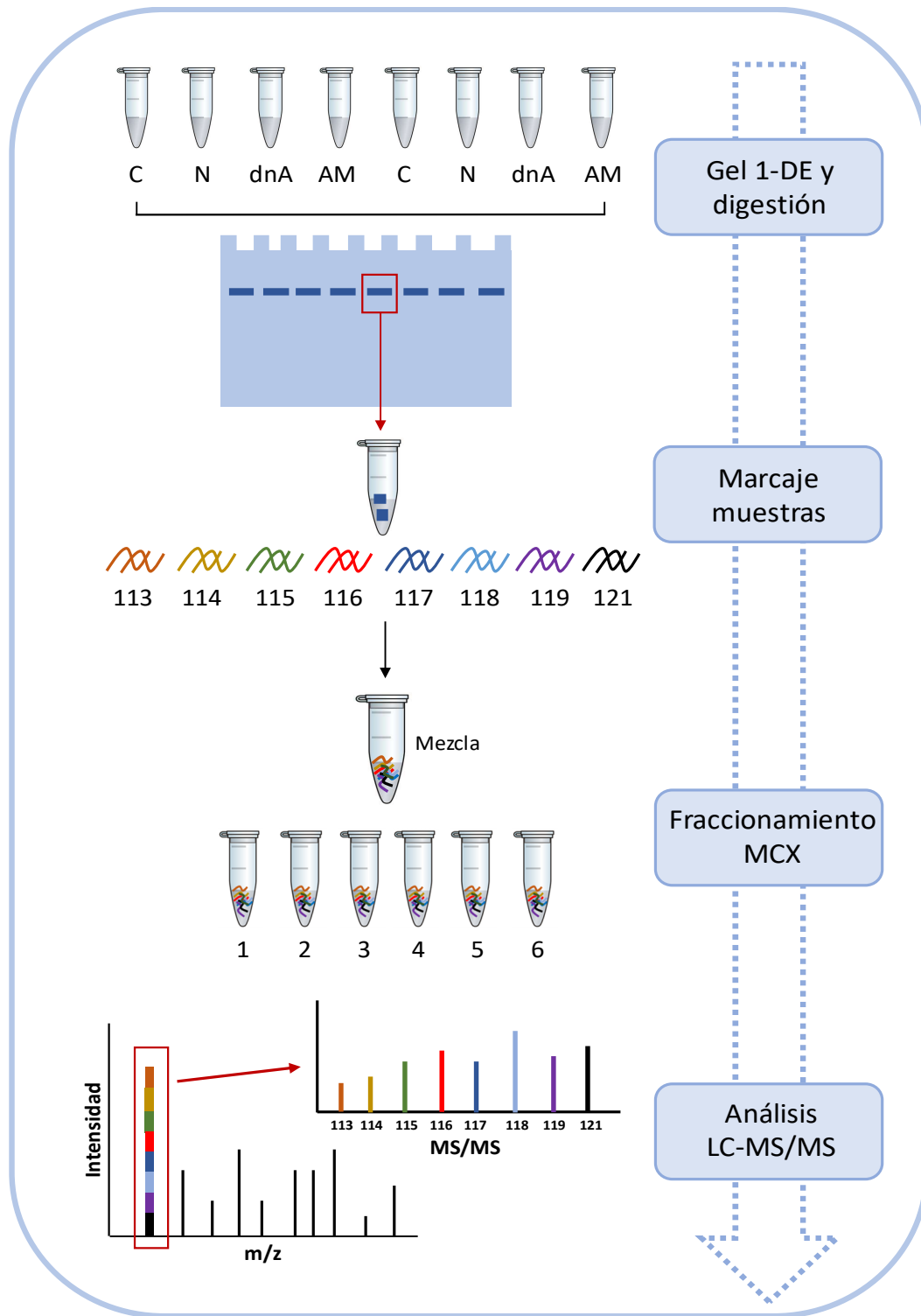
Cuatro réplicas biológicas de cada condición, cada una formada por dos individuos, fueron analizadas en dos experimentos iTRAQ-8plex (N1-N4, dnA1-dnA4 and SA1-S4). Además, en todos los casos, se incluyeron 8 individuos sanos que fueron usados como referencia para los análisis cuantitativos (C1-C4). Para ello se cargaron las muestras en un gel SDS-PAGE con el objetivo de concentrar las proteínas en una única banda. Antes de llevar a cabo la digestión, se realizaron dos pasos consecutivos de reducción de los puentes disulfuro con DTT 10 mM y posterior alquilación de dichos grupos con IAA 50 mM. Seguidamente se realizó la digestión con 60 ng/ml de tripsina porcina modificada (Promega) a una relación 12:1 de proteína: tripsina en BCA 50 mM, pH 8.8 con acetonitrilo (ACN) 10% durante toda la noche a 37°C. Pasado este tiempo se detuvo la reacción con 1 µl de ácido trifluoroacético (TFA) (Merck). La extracción de péptidos tripticos se realizó con bicarbonato amónico (BCA) 12 mM, pH 8.8 y después

con TFA 0.5%. Posteriormente, se realizó la desalinización de las muestras en cartuchos C18 Oasis-HLB (Waters) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para llevar a cabo el marcaje de las muestras, se determinó la concentración de péptidos mediante el sistema de detección directa (*Direct Detect*, Millipore) y se marcaron utilizando el kit comercial de reactivos iTRAQ Multiplex 8-plex (AB Sciex) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los diseños experimentales tanto para plasma como para VEs quedan representados en la Tabla 3. Las muestras marcadas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y pasado este tiempo, se detuvo la reacción con TFA 0.5%. Después, se mezclaron todas las muestras marcadas en un único tubo, se concentraron en el *SpeedVac* y se realizó otro paso de limpieza mediante los cartuchos C18 Oasis-HLB. Por último, con el fin de incrementar el número de identificaciones, las muestras se fraccionaron por cromatografía de intercambio catiónico en columnas Oasis HLB-MCX (Waters) en seis fracciones para su posterior análisis.

Etiqueta	Plasma		VEs del plasma	
	iTRAQ 1	iTRAQ 2	iTRAQ 3	iTRAQ 4
113	C-1	AM-4	C-1	C-1
114	N-1	dnA-4	N-1	dnA-3
115	dnA-1	N-4	dnA-1	AM -3
116	AM-1	C-4	AM-1	N-3
117	C-3	AM-2	C-2	C-2
118	N-3	dnA-2	N-2	dnA-4
119	dnA-3	N-2	dnA-2	AM-4
121	AM-3	C-2	AM-2	N-4

**Tabla 3. Diseño experimental de los estudios proteómicos diferenciales tanto en plasma como en las vesículas extracelulares del plasma mediante iTRAQ.** C: control; N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

En la Figura 14 se representa el esquema general de la metodología iTRAQ.



**Figura 14. Figura representativa de la metodología empleada en el análisis proteómico iTRAQ.** Las muestras de los distintos grupos se cargaron en un gel unidimensional para concentrar las y después se realizó la digestión en gel con tripsina. Posteriormente se marcaron las muestras y se mezclaron en un único tubo para realizar el fraccionamiento por cromatografía de intercambio catiónico y se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. C: control; N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

#### 4.4. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y BÚSQUEDAS EN BASES DE DATOS

##### 4.4.1. Identificación de proteínas diferenciales del análisis 2D-DIGE mediante MALDI-TOF/TOF:

Los análisis por espectrometría de masas se realizaron en colaboración con la Unidad de Proteómica del Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM (Toledo). Las manchas escindidas de los geles fueron digeridas automáticamente en un digestor *Ettan Digester* (GE Healthcare) siguiendo el protocolo descrito por Shevchenko y col<sup>134</sup>, con mínimas modificaciones. Para ello, los fragmentos del gel se sometieron a una reducción con DTT 10 mM y alquilación con 55 mM IAA, disueltos en BCA 50 mM en ambos casos. Seguidamente, se lavaron con BCA 50 mM en metanol 50% y ACN 70% y se secaron en un *SpeedVac*. A continuación, se añadió tripsina a una concentración de 20 ng/μl en BCA 20 mM y se incubó toda la noche a 37 °C. Pasado este tiempo, para realizar la extracción peptídica, se añadieron a las muestras ACN acuoso 60% y TFA 0.5%.

Una vez finalizada la digestión, 0.5 μl de la muestra se depositó en una placa del espectrómetro 384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI (AB Sciex) y se añadió el mismo volumen de matriz (3mg/ml de ácido α-ciano-4-hidroxycinnámico (Sigma-Aldrich) en ACN acuoso 60% y TFA 0.5%) en cada una de las muestras. Los espectros de MS y MS/MS se obtuvieron en modo automático utilizando un espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (AB Sciex). Para realizar el análisis automático de los espectros de masas se utilizó el programa informático 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (AB Sciex). La calibración interna de los espectros de masas del MALDI-TOF se llevó a cabo empleando 2 iones resultantes de la autodigestión de la tripsina ( $m/z = 842.510$  y  $m/z = 2211.105$ , respectivamente). Para las calibraciones del MALDI-MS/MS, se utilizaron espectros de iones fragmento obtenidos a partir de una mezcla de calibrantes de la casa comercial (4700 Cal Mix, AB Sciex). Los datos de MS y MS/MS se combinaron mediante el programa *GPS Explorer* versión 3.6 (AB Sciex), que permitió la realización de búsquedas no redundantes en la base de datos de proteínas *Swissprot* 2013\_10 usando el programa *Mascot* versión 2.2 (Matrix Science)<sup>135</sup> con una tolerancia de precursor de masas de 50 ppm, tolerancia de fragmento MS/MS de 0.6 Da, carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, oxidación de metionina como variable y la presencia máxima de un único punto de corte fallido por parte de la tripsina. Los espectros de MS y MS/MS y las búsquedas fueron revisadas manualmente



en detalle usando el programa comentado previamente. Las identificaciones de proteínas en base a los datos combinados de MS y MS/MS fueron aceptadas cuando su I.C.%, proporcionado por el programa *GPS Explorer* era del 95% o superior. En cambio, para los espectros de huella peptídica (PMF) las identificaciones fueron aceptadas cuando los I.C. % fueron del 99% o superiores.

#### **4.4.2. Identificación y análisis diferencial cuantitativo mediante iTRAQ por LC-MS/MS:**

Los péptidos marcados se cargaron en el sistema LC-MS/MS y se analizaron utilizando una nano-columna C-18 de fase reversa (75  $\mu$ m I.D. x 50 cm, 2  $\mu$ m particle size, Acclaim PepMap RSLC, 100 C18; Thermo Fisher) en un gradiente continuo de ACN compuesto de diferentes etapas: en 0-30% B en 360 min, 50-90% B en 3 min (A = ácido fórmico 0,5%; B = ACN 90%, ácido fórmico 0,5%). Se utilizó una velocidad de flujo de 200 nl/min para la elución de los péptidos de la nano-columna a una aguja de “nano-spray” emisora para la ionización en tiempo real y fragmentación del péptido en un espectrómetro de masas Q Exactive Híbrido Cuadrupolo-Orbitrap (Thermo Fisher).

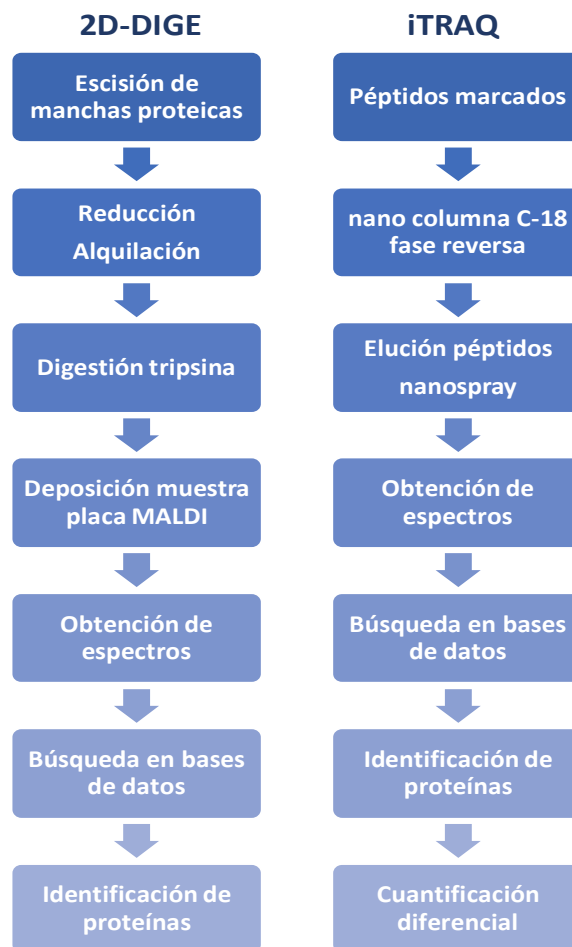
El análisis de los espectros para llevar a cabo la identificación de proteínas se realizó con el paquete informático *Proteome Discoverer* versión 1.4.0.29 utilizando SEQUEST-HT (Thermo Fisher). Para la búsqueda en la base de datos *Uniprot*, que contiene todas las secuencias de humano y contaminantes (06 de marzo de 2013; 70024 entradas), los parámetros que se seleccionaron fueron los siguientes: digestión con tripsina con dos sitios de corte perdidos como máximo, tolerancias de masas de precursores y fragmentos de 2 Da y 0.002 Da, respectivamente, como modificaciones fijas, carbamidometil cisteína y modificaciones iTRAQ en los residuos N-terminal y Lys y la oxidación de metioninas como modificación variable. La identificación de los péptidos se validó empleando el método por tasa de probabilidades<sup>136</sup> con un filtro adicional de tolerancia de masa del precursor de 12 ppm. La tasa de falsos positivos (FDR, *false discovery rate*) se calculó utilizando las bases de datos invertidas y el método refinado<sup>137</sup> con un filtro adicional para el precursor de tolerancia de masa 10 ppm<sup>138</sup>. Sólomente los péptidos identificados con un I.C. % del 95% se utilizaron para llevar a cabo la cuantificación relativa de cada péptido<sup>139</sup>.

La cuantificación diferencial de proteínas se realizó en función de las intensidades de los iones reporteros así como el análisis estadístico de los datos utilizando el programa

*QuiXoT*, basado en un modelo estadístico descrito previamente<sup>140</sup>. En este modelo, los log2-ratios fueron expresados en forma de variables estandarizadasvalor  $Z_q$ . En estos análisis, se consideró proteínas diferencialmente expresadas, aquellas identificadas con más de dos péptidos y con valores de  $Z_q = \pm 1.5$ , siendo  $Z_q$  la media de las réplicas.

En el caso del análisis de las VEs, todas las proteínas diferenciales encontradas fueron buscadas frente a dos bases de datos de VEs: *Vesiclepedia* y *EVpedia* con el fin de encontrar evidencias de sus niveles de expression en VEs, tanto MVs y exosomas, a nivel de proteína o mRNA.

En la Figura 15 se representa de manera esquemática las distintas etapas llevadas a cabo para la identificación de proteínas procedentes del análisis diferencial mediante 2D-DIGE así como también, para la identificación de proteínas y el análisis diferencial cuantitativo mediante iTRAQ.



**Figura 15.** Esquema representativo del flujo de trabajo realizado para la identificación de proteínas del análisis diferencial mediante 2D-DIGE y análisis diferencial cuantitativo realizado en el análisis iTRAQ.

## 4.5. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.5.1. Monitorización de la reacción seleccionada (SRM)

Las proteínas fueron reducidas con DTT 100 mM durante 30 minutos a 37°C y alquiladas con IAA 550 mM durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad, diluidas en BCA 50 mM. La digestión de proteínas se realizó con tripsina a una relación final de 1 µg de tripsina: 50 µg proteína en BCA 50 mM y ACN 15% durante toda la noche a 37°C. Tras la digestión, la reacción se detuvo añadiendo ácido fórmico 2% en BCA 50 mM durante 30 min a 37°C y las muestras se limpiaron utilizando unas columnas de centrifugación con resina C18 (*Pep-Clean spin columns*, Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los péptidos digeridos se secaron en el *SpeedVac* y se resuspendieron en una solución de ACN 2% y ácido fórmico 2% antes del análisis por MS.

El sistema LC-MS/MS estaba compuesto por un nano-LC TEMPO (AB Sciex) combinado con un muestreador automático nano-LC y acoplados a un triple cuadrupolo 4000 QTRAP (AB Sciex) con una fuente NanoSprayII (AB Sciex). Se realizaron tres réplicas de inyecciones para cada muestra (4 µl que contiene 20 µg de proteína) utilizando una fase móvil A (ACN 2%/agua 98% y FA 0.1%) con una velocidad de flujo de 10 µl/min durante 5 min. Los péptidos se cargaron en un cartucho de microprecolumna de Acclaim Pep Map 100 C18, 5 µm, 100Å; 300 µm i.d. X 5mm, (LC Packing), para preconcentrar y desalinizar las muestras. La cromatografía líquida de fase reversa se llevó a cabo en una columna C18 de diámetro interno 150 x 0.1mm (*Onyx Monolithic*, Phenomenex) en un gradiente de fase A y fase B (ACN 98%/agua 2% y FA 0.1%). Los péptidos se eluyeron a una velocidad de flujo de 900 nl/min siguiendo los siguientes pasos: 2 a 15% B durante 2 min, 15-30% B durante 18 min, 30-50% B durante 5 min, 50-90% B durante 2 min y 90% de durante 3 min. La columna se regeneró con un 2% B durante 15 minutos.

El espectrómetro de masas se configuró para operar en modo de iones positivos con voltaje capilar de 2800 V y a una temperatura del interfaz de 150°C. El algoritmo IntelliQuan incluido en el programa *Analyst* se utilizó para calcular la abundancia relativa de cada muestra en base a las áreas de los picos correspondientes después de cada integración normalizadas al cromatograma total iónico (TIC, *total ion chromatogram*).

El flujo de trabajo realizado en el análisis mediante SRM queda resumido en la Figura 16.

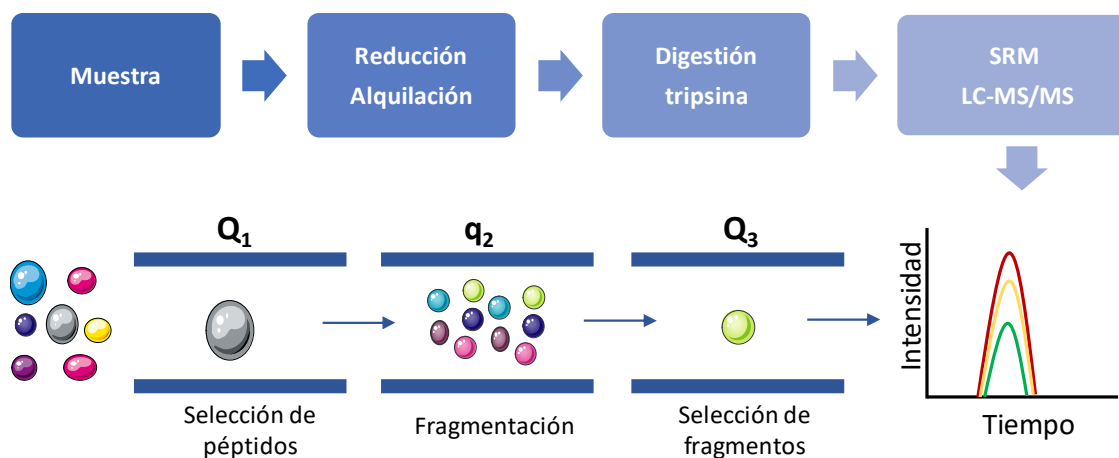
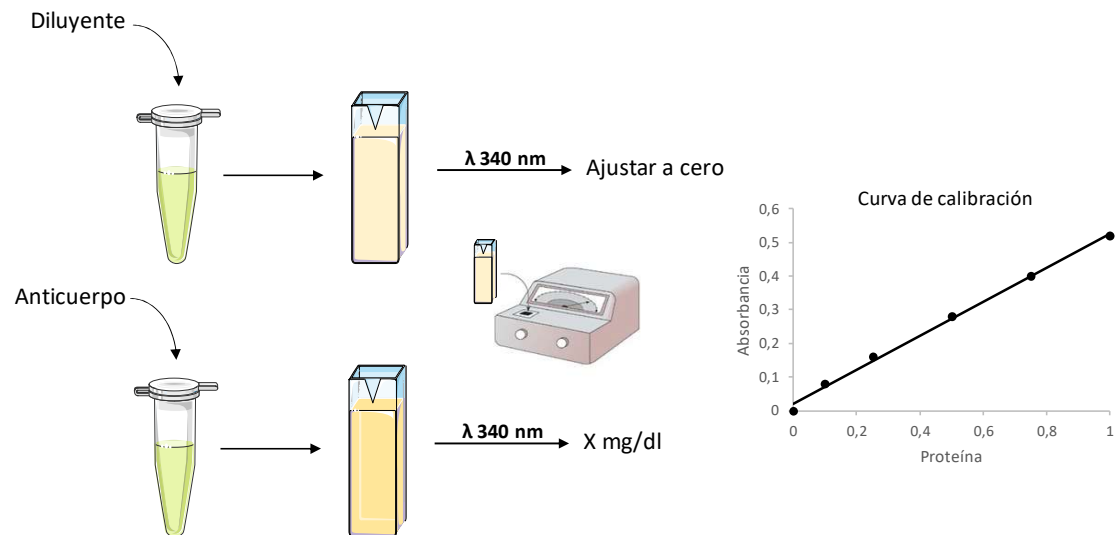


Figura 16. Esquema representativo de la metodología utilizada en la técnica SRM.

#### 4.5.2. Turbidimetría

Los ensayos por turbidimetría se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Análisis Clínicos Seralab en Oviedo utilizando un analizador químico BS200E (Mindray). El principio de este método está basado en la combinación de anticuerpos específicos con las muestras a analizar formando compuestos insolubles. Estos compuestos producen un cambio de absorbancia que es dependiente de la concentración de proteína de la muestra analizada, lo cual puede ser cuantificado mediante la comparación con un calibrador de concentración de proteína conocida. Para realizar estos ensayos, los reactivos incluían un tampón de dilución (tris 20mM/l, polietilenglicol 8000, pH 8.3, azida sódica 0.95 g/l), suero de cabra, un calibrador y un control de calidad siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Todos los reactivos utilizados eran de la marca Spinreact. Brevemente, la cantidad adecuada de muestra para cada medición se mezcló con una solución diluyente y se midió la absorbancia basal de la muestra utilizando una longitud de onda de 340nm tras ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada. Después, se añadió el anticuerpo correspondiente a la muestra, se incubó durante 2 min y se realizó la cuantificación. La concentración de proteína de cada muestra fue calculada en base a una calibración de 6 (Figura 16).



**Figura 16.** Representación esquemática del protocolo utilizado en los ensayos mediante turbidimetría.

#### 4.6. BIOLOGÍA DE SISTEMAS

Con el objetivo de caracterizar los procesos biológicos que se encuentran alterados en los distintos grupos del estudio, se ha llevado a cabo un análisis de las proteínas diferencialmente expresadas atendiendo a sus funciones biológicas, procesos moleculares y análisis de las interacciones proteicas. Para ello, se han utilizado varias herramientas bioinformáticas como DAVID (*Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery*)<sup>141</sup> versión 6.7, PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*)<sup>142</sup> versión 11.0 y STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*)<sup>143</sup> versión 10.0. Además, en los análisis diferenciales mediante iTRAQ, realizados tanto en plasma como en las VEs del plasma, se ha empleado un nuevo algoritmo llamado el triángulo de biología de sistemas (SBT, *system biology triangle*)<sup>144</sup> que permite detectar categorías funcionales basadas en el comportamiento coordinado de un conjunto de proteínas.

## 5. ENSAYO *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE DOS NUEVOS MARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES HIPERTENSOS CON ALBUMINURIA

En este trabajo, hemos realizado un análisis *in vitro* para estudiar el papel de dos proteínas diferencialmente expresadas en las VEs del plasma de pacientes con albuminuria en la disfunción endotelial. Para ello, se aislaron y expandieron CEs a partir una vena safena de humano adulto mediante un protocolo de tripsinización y purificación con perlas magnéticas. Posteriormente, se caracterizó el fenotipo endotelial mediante la evaluación de marcadores específicos de las CEs por citometría de flujo y microscopía confocal y, por último, se llevó a cabo un ensayo invitro en CEs activadas con TNF- $\alpha$  con el objetivo de medir la expresión de Kalirina y CHD7 en estas células mediante citometría de flujo y microscopía confocal (Figura 17).

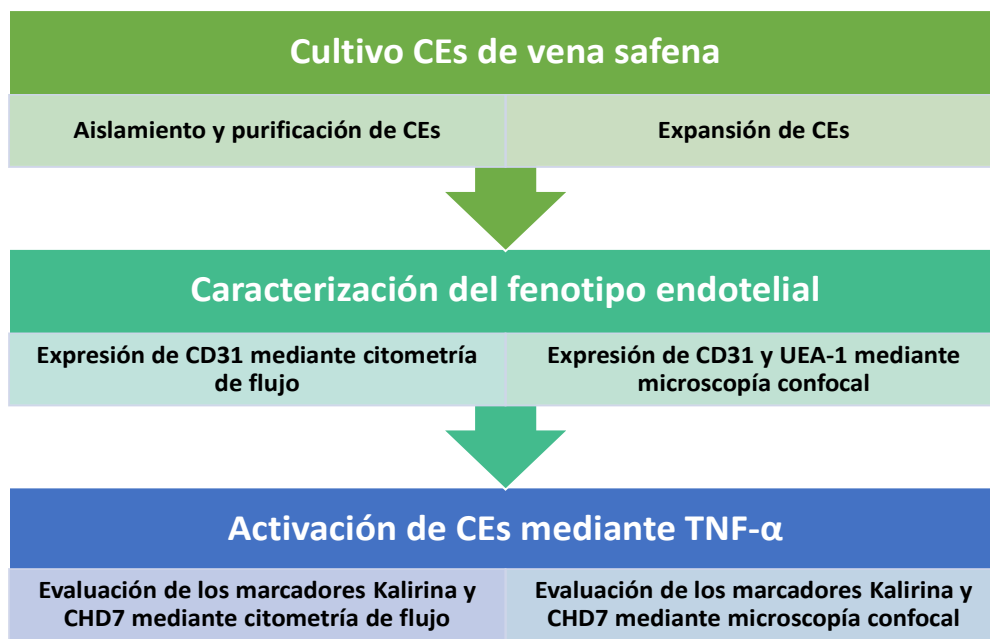


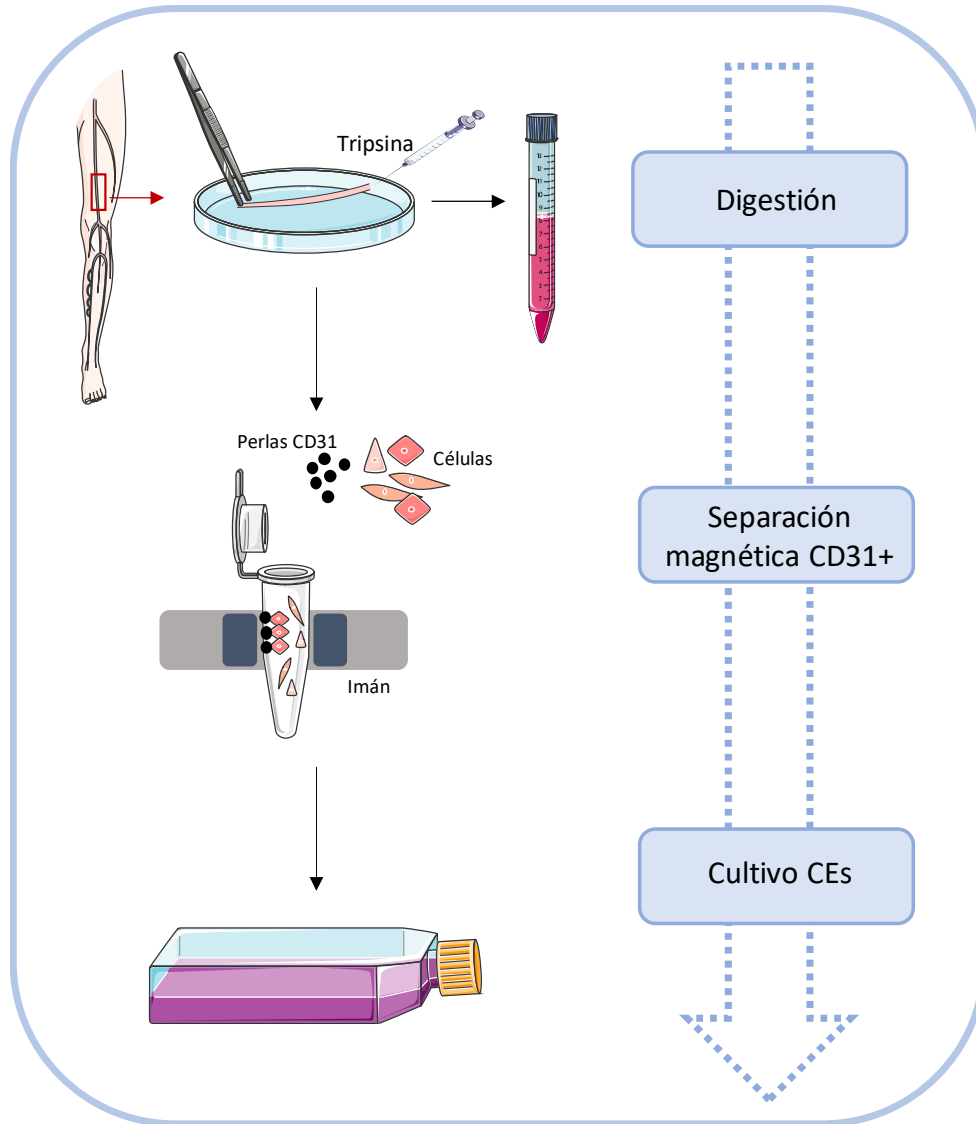
Figura 17. Esquema general de las distintas metodologías realizadas para el estudio de los marcadores de disfunción endotelial en pacientes hipertensos con albuminuria a partir de CEs aisladas de vena safena de adulto.

### 5.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Las células endoteliales (CEs) fueron aisladas a partir de vena safena humana de individuo adulto. Con ayuda de unas pinzas estériles, se separó el tejido para proceder a la perfusión de la vena con tripsina 136-ácido etilenoaminotetraacético (tripsina-EDTA)

(Gibco) y la digestión del interior de la vena. Para ello, con ayuda de una jeringa se introdujeron 3 ml de tripsina-EDTA y se dejó incubar durante 5 min. Pasado este tiempo se detuvo la reacción añadiendo 9 ml de solución de neutralización (medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS, *fetal bovin serum*) 10%). Después, se recogió todo el volumen y se llevó a un tubo de 15 ml para centrifugarlo a 300 g (5804R, Eppendorf) durante 5 min. a 4°C. El precipitado de células se lavó y se resuspendió en 10 ml de un tampón de aislamiento (ácido citrato-dextrosa (ACD) 0.6% en PBS, glucosa 2.2%, citrato sódico 2.2%, ácido cítrico 0.5% y BSA 0.5%).

Posteriormente, se realizó la purificación de CEs mediante el empleo del separador magnético MACS (Miltenyi Biotec) utilizando unas perlas magnéticas recubiertas de CD31 (*Dynabeads*, Invitrogen). Para ello, se centrifugaron las células a 300 g durante 5 min. y se eliminó el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendió en 1ml de tampón de aislamiento y después, la solución celular se llevó a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Se añadió a la muestra 5 µl de las perlas magnéticas cubiertas del anticuerpo anti-CD31 (dilución 1:200) y se incubaron durante 5 min. a 4°C con una rotación constante. Las células CD31-positivas se unieron a las perlas magnéticas y seguidamente se colocó el tubo en el soporte magnético y se mantuvo durante 1 min. de forma que las perlas se unieron al imán y quedaron pegadas a la pared del tubo, dejando al resto de células (fracción CD31 negativa) libres en la suspensión mientras el tubo permanecía en el imán. Pasado el minuto, se eliminó el sobrenadante y se retiró el tubo del soporte. A continuación, se añadió de nuevo 1 ml de tampón de aislamiento y se repitió este paso tres veces más. Finalmente, las células se resuspendieron en un medio de crecimiento endotelial (EGM-2 (*“Endothelial Cell Growth Medium”*) suplementado con un 20% de FBS y glutamina-penicilina-estreptomicina (GPS) (Invitrogen)) y se cultivaron las células en frascos cubiertos de gelatina 1% (Gibco) a una temperatura de 37°C y en una atmósfera humidificada al 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Figura 18). Cuando las células endoteliales mostraron una capa uniforme que cubría aproximadamente el 70 % de la superficie, se consideró pase 0.



**Figura 18.** Representación esquemática de la metodología utilizada para la purificación de células endoteliales aisladas de vena safena de adulto. CEs: células endoteliales.

## 5.2. EXPANSIÓN DE LAS CEs

Todos los pases de las CEs procedentes de vena safena se realizaron en frascos de cultivo de cultivo con filtro de 25 cm<sup>2</sup> de superficie y a una densidad de 10x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> utilizando el medio de crecimiento endotelial descrito en el apartado anterior. Cada 3 días se reemplazó el medio de cultivo y cuando las células alcanzaron el 80-90% de la confluencia se realizó otro pase mediante la interrupción de la adherencia celular con una solución de tripsina-EDTA. Tras ello, las células fueron cultivadas de nuevo en frascos de cultivo a una densidad de 10x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>.



### 5.3. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO ENDOTELIAL

Para confirmar el linaje endotelial, se analizó por citometría de flujo la expresión positiva de CD31 y negativa de los marcadores CD45 y CD90. Además, mediante dos tinciones inmunofluorescentes, se visualizó la expresión de CD31 y la proteína UEA-1 (*Ulex Europaeus Lectin I*), marcadores específicos de las CEs.

#### 5.3.1. Citometría de flujo

Las CEs cultivadas en los frascos de cultivo, se tripsinizaron. Para ello, se eliminó el medio de crecimiento endotelial y se hizo un lavado de PBS. Seguidamente, se añadió 1 ml de tripsina-EDTA y se incubó durante 5 min. a 37°C. Después, se añadió 3 ml de la solución de neutralización y se centrifugó a 300 g durante 5 min. a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con 5 ml de una solución de lavado FACS (BSA 0.5%, EDTA 2mM, PBS). Después se centrifugaron de nuevo a 150 g durante 5 min. a 4°C y se realizó el conteo de células mediante el empleo de una cámara de Neubauer. Se calculó el volumen necesario para marcar 100.000 células y se llevó el volumen correspondiente a tubos eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, se realizó otra centrifugación a 150 g durante 5 min. a 4°C y las células se resuspendieron en 100 µl de solución FACS. Para realizar el marcaje se añadió a la muestra el anticuerpo CD31 conjugado con FITC (1:50), el anticuerpo CD45 conjugado con PerCP (1:20, BD Biosciences) y el anticuerpo CD90 conjugado con APC (1:20, BD Biosciences). Además, se preparó un control negativo marcado con el isotópico IgG-FITC (1:50), IgG-APC (1:20, Miltenyi Biotec) e IgG-PerCP (1:20, Lab clinics). Se incubaron durante 20 min. a 4°C, en oscuridad y se centrifugaron a 300 g durante 3 min. Después, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 400 µl de solución FACS. Se realizó el mismo paso de centrifugación y lavado una vez más y finalmente las células se resuspendieron en 250 µl de FA 1% y se analizaron en el citómetro FACS CANTO II.

#### 5.3.2. Microscopía confocal

Las CEs cultivadas en platos de cultivo de 60 x 15 mm se lavaron con PBS y se permeabilizaron con triton X-100 0.2 % en PBS durante 10 min. Tras ello, se realizaron 2 lavados en PBS, se incubaron en una solución de bloqueo (BSA 1.5% en PBS) durante 30 min y se realizaron 2 lavados en PBS. Para llevar a cabo el marcaje con CD31 y UEA-1, marcadores específicos de las CEs, se añadió en uno de los pocillos el anticuerpo CD31 conjugado con FITC (1:50) y en otro pocillo el anticuerpo UEA-1

## *Material y Métodos*

(1:50, Vector laboratorios). Se incubaron durante 40 min. a temperatura ambiente y pasado este tiempo se realizaron 2 lavados en PBS.

Para poder visualizar los núcleos, se realizó el marcaje con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1:1000, Life technologies) durante 20 min. Tras 2 lavados más en PBS, el pocillo marcado con el anticuerpo CD31-FITC se incubó con el anticuerpo secundario Alexa 488 (1:1000, Life technologies) durante 1 hora. Finalmente, los pocillos se lavaron con PBS y se dejaron en 1ml de PBS para poder visualizarlos posteriormente en el microscopio confocal SP5 TCS (Leica).

En la Figura 19 se detalla esquemáticamente los distintos protocolos descritos en este apartado.

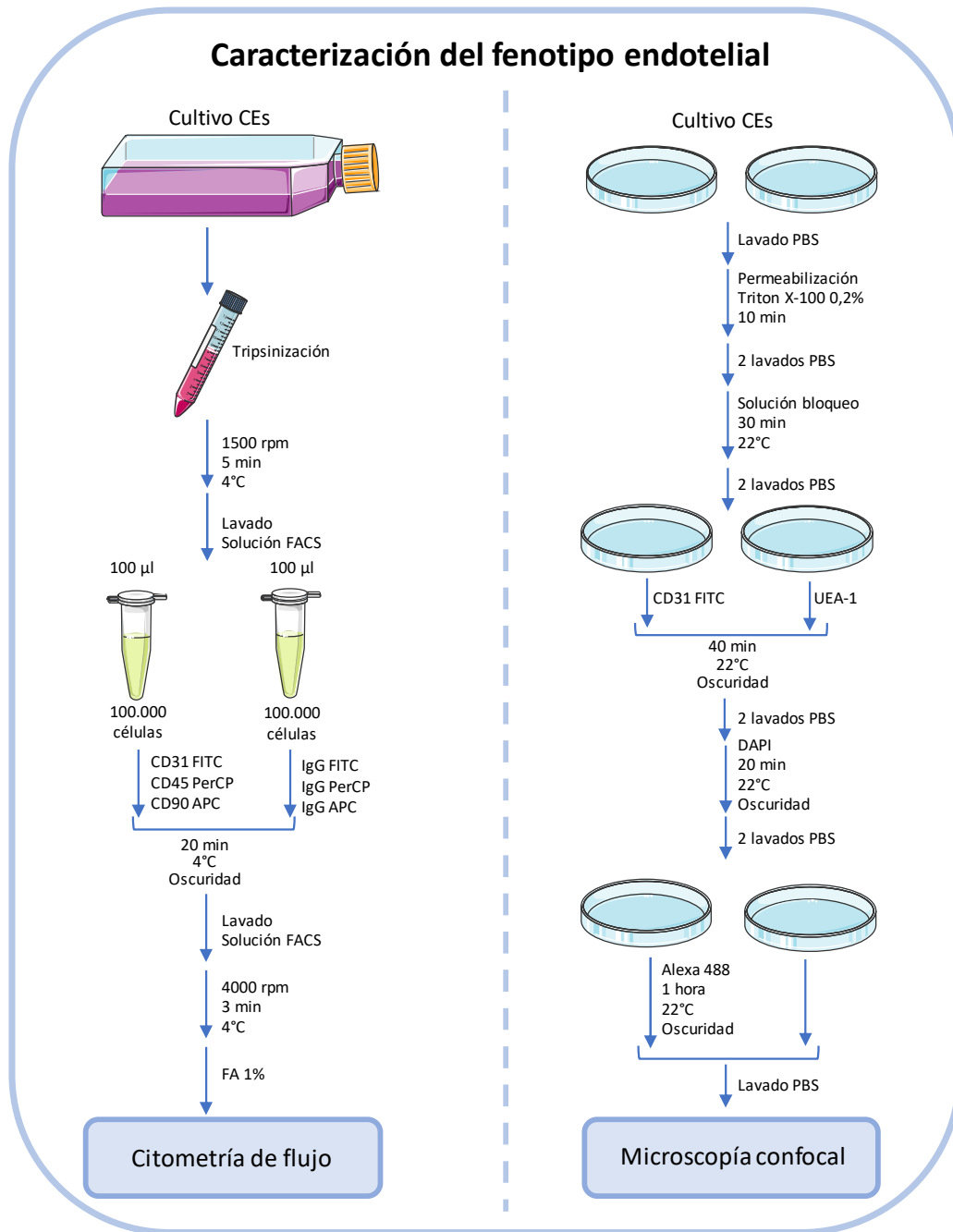


Figura 19. Esquema representativo de las metodologías llevadas a cabo para la caracterización del fenotipo endotelial mediante citometría de flujo y microscopía confocal.

#### 5.4. ACTIVACIÓN DE CEs MEDIANTE EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

Para activar las CEs aisladas de la vena safena de adulto, las células se trataron con el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Para ello, se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y en el caso de la tinción inmunofluorescente, las células se sembraron en cubreobjetos circulares. Tras 18 horas en cultivo, las CEs se

trataron durante 5 horas con TNF- $\alpha$  10 ng/ml en medio EBM-2 (*Endothelial basal medium*, Lonza) o únicamente con medio de crecimiento endotelial, que utilizaremos como control negativo. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio y se realizaron dos lavados con PBS.

#### **5.4.1. Evaluación de los marcadores Kalirina y CHD7 mediante citometría de flujo**

Para el análisis mediante citometría de flujo, se llevó a cabo la tripsinización y marcaje de las células. Para ello, se añadió 1 ml de tripsina por pocillo y se dejó 5 min. a 37°C. Después, se detuvo la reacción añadiendo 3 ml de solución de neutralización y se centrifugaron a 300 g 5 min. a 4°C. Se realizó un lavado con solución FACS y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Posteriormente, se incubaron las células durante 1 hora a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios de superficie: E-Selectina (CD62E-APC) (1:20, BD Biosciences), y VCAM-1 (CD106-PE) (1:10, BD Biosciences). Tras esta incubación, las células se fijaron con FA 1% y se permeabilizaron con triton X-100 0.1% en PBS durante 15 min. cada paso y a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron durante 90 min. a 4°C con los anticuerpos primarios para las proteínas intracelulares Kalirina (1:25, Santa Cruz) y CHD7 (1:50, Abcam). A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488 (1:1000) durante 90 min. a 4°C. En el caso de los controles negativos, uno para las células tratadas con TNF- $\alpha$  y el otro para las células con medio de crecimiento endotelial, se incubaron con los siguientes anticuerpos isotípicos: IgG-APC (1:20) e IgG-PE (1:10). Después, se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 3 min. y se resuspendieron en 400  $\mu$ l de solución FACS. Por último, se realizó otro paso de centrifugación y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de FA 1%. Las muestras se analizaron en el citómetro FACS CANTO II.

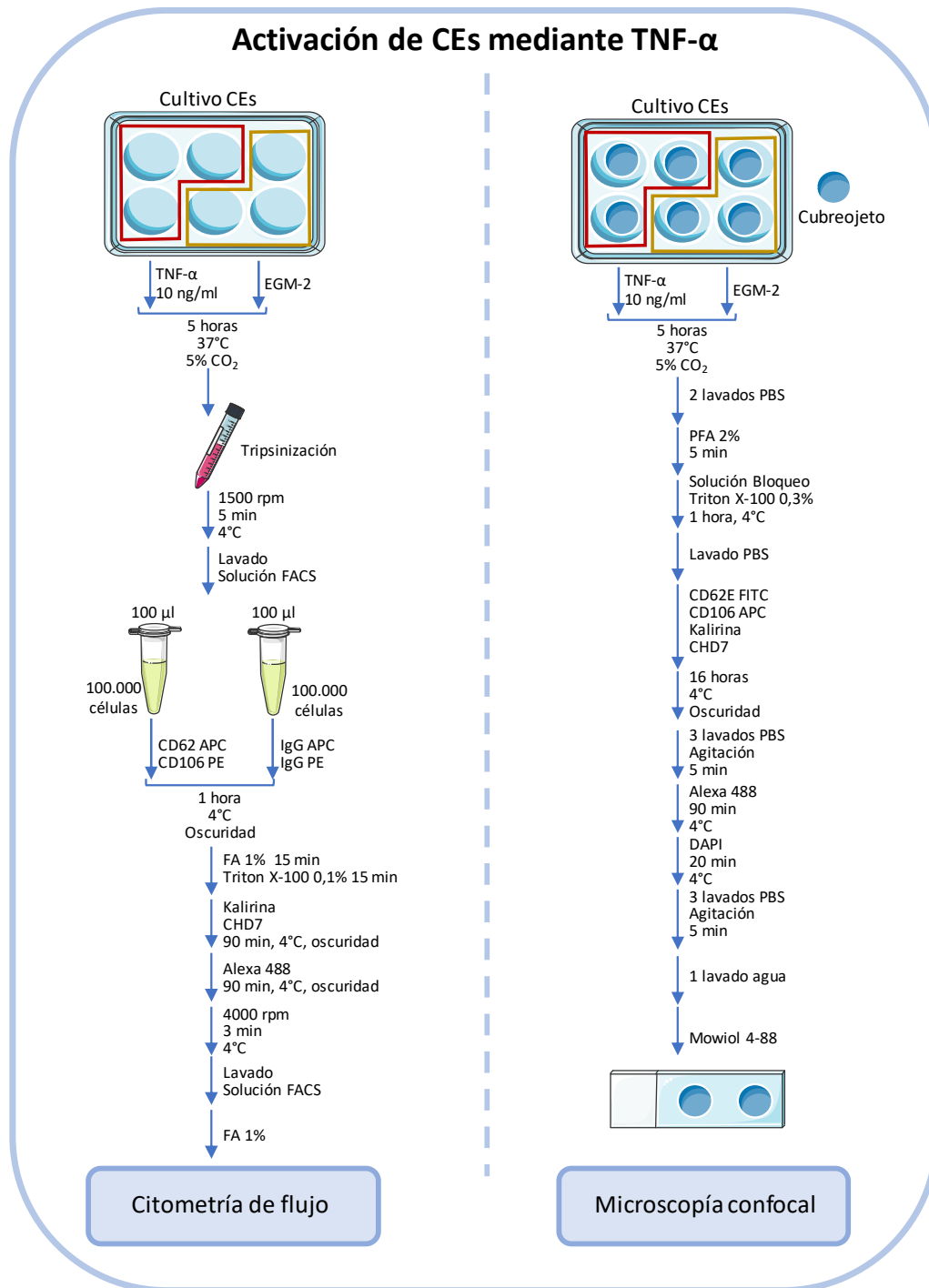
#### **5.4.2. Evaluación de los marcadores Kalirina y CHD7 mediante microscopía confocal**

Para llevar a cabo la tinción inmunofluorescente, se eliminó el medio de crecimiento endotelial y se realizaron dos lavados con PBS. Tras ello, las CE fueron fijadas con PFA 2% durante 5 min. y bloqueadas en una solución que contenía BSA 10%, triton X-100 0.3% en PBS durante 1 hora a 4°C. Después, se realizó un lavado en PBS y se incubaron las células durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: CD62-E (1:20), CD106-APC (1:10), Kalirina (1:25) y CHD7 (1:50).

## *Material y Métodos*

Posteriormente, se realizaron 3 lavados en PBS de 5 min. cada uno y en agitación. Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488 (1:1000) durante 90 min. a 4°C y después, con DAPI (1:1000) durante 20 min. Por último, se realizaron 3 lavados en PBS y uno final con agua bidestilada, de 5 min. cada uno y en agitación. Para poder visualizar las inmunofluorescencias en el microscopio, se montaron los cubreobjetos con Mowiol 4-88 y se dejaron secar al menos 4 horas a 4°C. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal TCS SP5 (Leica). La configuración de los detectores y la captura de las imágenes se efectuaron con el programa LAS AF (*Leica Application Suite Advanced Fluorescence*). Las señales de diferentes fluoróculos fueron tomadas de forma secuencial.

En la Figura 20 queda detallado de manera esquemática los distintos protocolos realizados para la evaluación de los marcadores Kalirina y CHD7 mediante citometría de flujo y microscopía confocal.



**Figura 20.** Esquema representativo de los protocolos realizados para la activación de CEs mediante el TNF- $\alpha$  y la evaluación de los marcadores Kalirina y CHD7 mediante citometría de flujo y microscopía confocal. CEs: células endoteliales.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de las características clínicas de los pacientes se representaron como la media  $\pm$  desviación estándar o porcentajes. Para determinar la significación estadística entre las variables continuas se realizó un test de ANOVA. En el caso de las variables discretas, se empleó la prueba de Fisher (Mann-Whitney) para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos. Para determinar el cálculo de las diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de proteínas, se aplicó la prueba *t*-student, cuando los grupos a comparar eran 2 y el test de ANOVA y como análisis post-hoc Tukey, en el caso de que la comparativa se realice en 3 grupos. En todos los casos se realizó la prueba de homogeneidad de las varianzas mediante el estadístico de Levene. La correlación de Pearson se empleó para determinar las asociaciones entre los niveles de proteínas y los niveles de albuminuria. Para calcular las diferencias de proteínas entre pacientes que progresan o no a albuminuria se realizó la prueba *t*-student. Se realizaron curvas de Característica Operativa del Receptor (ROC, *Receiver Operating Characteristic*) para evaluar la clasificación de los pacientes atendiendo a los paneles de proteínas diferenciales entre grupos. En cuanto a los estudios *in vitro*, cada experimento se repitió 3 veces y para estudiar las diferencias entre grupos se realizó una prueba *t*-student. Las significaciones estadísticas fueron aceptadas con \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc.).





# Resultados



## **1. ABORDAJE MULTI-PROTEÓMICO EN PLASMA DE PACIENTES HIPERTENSOS BAJO SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA CON DISTINTO GRADO DE AFECTACIÓN RENAL**

Con el objetivo de identificar perfiles moleculares asociados al desarrollo de la albuminuria y marcadores de daño renal en pacientes hipertensos con supresión crónica del SRA, se ha llevado a cabo un abordaje multi-proteómico mediante dos técnicas proteómicas complementarias: 2D-DIGE e iTRAQ, en la primera fase de descubrimiento. Para ello, hemos analizado 24 pacientes hipertensos clasificados en tres grupos atendiendo a los niveles de albúmina excretada en orina y al tiempo de aparición de la misma: 8 pacientes con normoalbuminuria (N), 8 pacientes con albuminuria *de novo* (dnA) y 8 pacientes con albuminuria mantenida en el tiempo (AM), descritos previamente en el apartado “Material y Métodos”. Estos pacientes fueron agrupados en 4 réplicas biológicas por cada grupo (N1-N1, dnA1-dnA4 y AM1-AM4) teniendo en cuenta sus características clínicas y niveles de albuminuria. Además, quedaron excluidos los pacientes con diabetes para evitar que pudiera ser un factor de confusión en los análisis diferenciales. Los datos correspondientes a las características clínicas y medicación de los individuos quedan recogidos en la Tabla 4.

Características basales	N (n=8)	dnA (n=8)	AM (n=8)	p-valor
Edad (años)	62 ± 6	63 ± 10	60 ± 10	0.806
Sexo (masculino), %	50	50	63	0.845
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 4	29 ± 3	30 ± 4	0.957
Fumador actual, %	0	13	25	0.355
Colesterol total (mg/dl)	194 ± 27	160 ± 17	188 ± 43	0.083
Triglicéridos (mg/dl)	86 ± 22	93 ± 30	136 ± 72	0.089
Colesterol HDL (mg/dl)	56 ± 14	53 ± 17	46 ± 11	0.411
Colesterol LDL (mg/dl)	121 ± 28	84 ± 11	114 ± 33	0.032
Glucemia (mg/dl)	100 ± 15	100 ± 11	107 ± 29	0.709
ACR (mg/g)	3.6 ± 2	66 ± 36	498 ± 380	0.001
Aclaramiento de creatinina (mg/ml)	88 ± 22	105 ± 42	84 ± 40	0.485
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	72 ± 30	79 ± 24	84 ± 13	0.601
Ácido úrico (mg/dl)	4.6 ± 1.1	5.9 ± 2	5.9 ± 1.6	0.195
Presión arterial sistólica (mmHg)	126 ± 9	134 ± 8	128 ± 16	0.385
Presión arterial diastólica (mmHg)	75 ± 10	81 ± 9	78 ± 13	0.549
<b>Medicación</b>				
Antihipertensivos, %				
IECA	25	13	13	0.741
ARB	75	87	87	0.741
Diurético	88	63	50	0.269
Antagonistas de calcio	75	25	63	0.113
Agente beta bloqueante	25	25	38	0.817
Agente alfa bloqueante	13	50	25	0.244
Otros tratamientos, %				
Agente anticoagulante	0	25	25	0.331
Agentes reductores de lípidos	88	75	75	0.801
Agente antidiabético	0	13	38	0.133

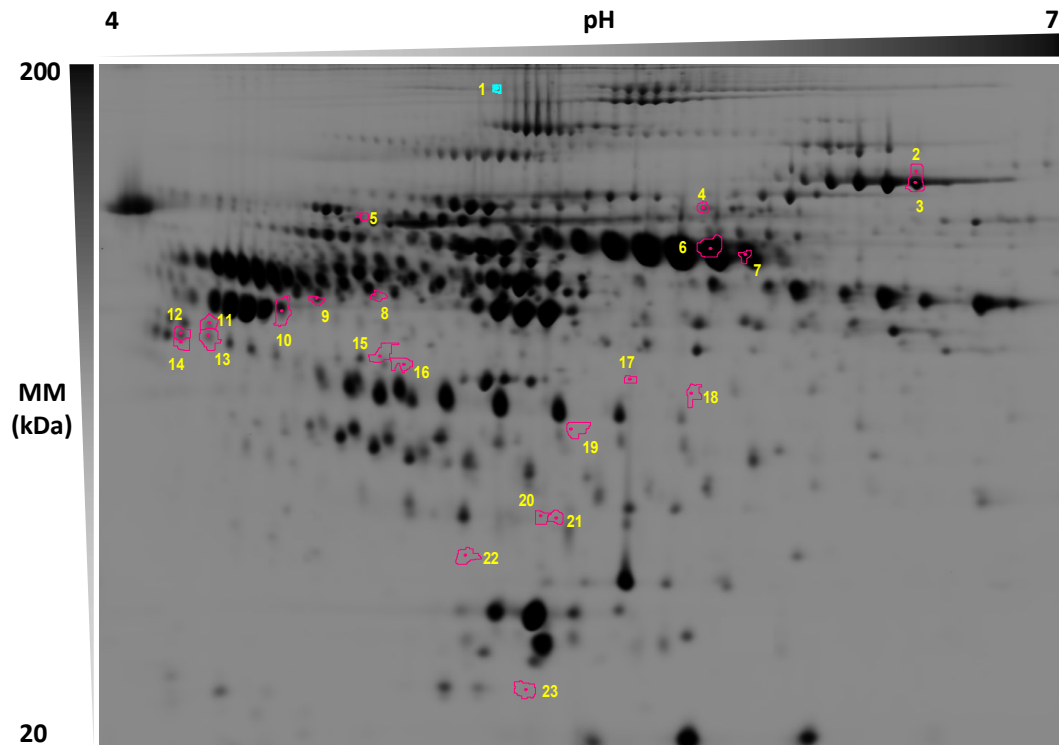
**Tabla 4. Características clínicas y medicación de la población de estudio utilizada en los análisis diferenciales en plasma mediante 2D-DIGE e iTRAQ.** Los valores son expresados como la media ± desviación estándar o porcentajes. IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; ACR: relación albúmina/creatinina; eGFR: tasa de filtrado glomerular estimado; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueantes de los receptores de angiotensina; N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

## 1.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL MEDIANTE 2D-DIGE

Para llevar a cabo el análisis diferencial mediante 2D-DIGE en muestras de plasmas, se analizaron 8 pacientes de cada grupo (N, dnA y AM) y un grupo de 8 individuos sanos (C) que fueron utilizados como referencia. Se prepararon un total de 8 geles bidimensionales, en el que cada gel contenía dos réplicas biológicas diferentes compuestas de dos individuos cada una. El diseño experimental del estudio se encuentra en la Tabla 2 del apartado “Material y Métodos”.

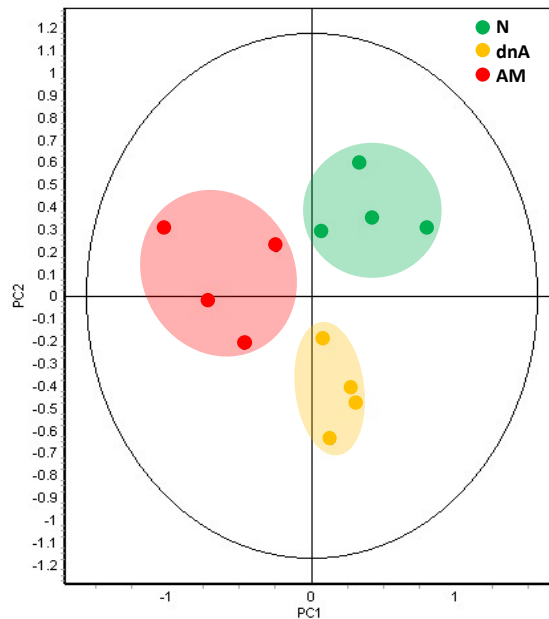
## Resultados

Los resultados tras la cuantificación de las manchas proteicas y el análisis diferencial entre los distintos grupos de estudio mostraron un total de 23 manchas proteicas diferencialmente expresadas ( $p$ -valor  $\leq 0.05$ ) (Figura 21).



**Figura 21.** Gel representativo del estudio 2D-DIGE donde aparecen marcadas las manchas proteicas diferencialmente expresadas. MM: masa molecular (kDa).

El análisis de componentes principales realizado con las 23 manchas proteicas diferenciales mostró una correcta agrupación de los pacientes correspondientes a los distintos grupos experimentales. Como podemos observar en la Figura 22, los grupos de pacientes N y dnA quedan perfectamente separados por la primera componente (PC1) del grupo AM. Por otro lado, podemos observar como el grupo de dnA queda separado por la segunda componente (PC2) del grupo N y del grupo AM por PC1, lo que podría indicar que estos pacientes se encuentran en un estadio intermedio entre los otros dos grupos de estudio.



**Figura 22. Gráfico del análisis de componentes principales.** En el análisis multivariante se observa que los tres grupos de estudio quedan perfectamente agrupados en función de los niveles de expresión de las 23 manchas proteicas diferencialmente expresadas. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

Del total de las manchas proteicas diferenciales se pudieron identificar 19 mediante MALDI-TOF/TOF que corresponden a 12 proteínas diferentes. En la Tabla 5 aparece el listado de las identificaciones, así como las variaciones entre grupos representados en escala de color (en azul las proteínas disminuidas y en rojo las proteínas aumentadas) y los resultados estadísticos. En algunos casos se identificó la misma proteína en varias manchas proteicas, todas ellas siguiendo la misma tendencia. Atendiendo al cociente de variación, en la comparativa dnA frente al grupo N se encontraron diferencias de expresión en 7 proteínas, 4 de ellas estaban disminuidas (proteína de unión a vitamina D (VTDB), hemopexina (HEMO), kininógeno1 (KNG1) y alfa-2 glicoproteína rica en leucina (A2GL)) y 3 proteínas aumentadas (complemento factor B (CFAB), globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) y proteína 2 relacionada con el complemento factor H (FHR2)). En la comparativa AM frente a dnA se encontraron 5 proteínas diferenciales aumentadas (factor XIII de coagulación cadena B (F13B), KNG1, A2GL, paraoxonasa 1(PON1), componente P del amiloide sérico (CFAB)) y la proteína CFAB disminuida. Por último, la comparación entre pacientes AM frente a N mostró el aumento de 4 proteínas diferenciales (inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4 (ITIH4), A2GL y PON1) y la proteína HEMO disminuida.

Nº mancha	Nº acceso (Uniprot)	Nombre de la proteína	Abreviatura	dnA / N		AM / dnA		AM / N	
				Av. Ratio	p-valor	Av. Ratio	p-valor	Av. Ratio	p-valor
1	P02774	Vitamin D-binding protein	VTDB	-1,4	0.03				
2	P00751	Complement factor B	CFAB	1,5	0.036				
3	P00751	Complement factor B	CFAB			-1,4	0.036		
4	P05160	Coagulation factor XIII B chain	F13B			1,6	0.018		
5	Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITI4					1,5	0.022
6	P02790	Hemopexin	HEMO	-1,3	0.001				
7	P02790	Hemopexin	HEMO					-1,4	0.041
8	P01042	Kininogen-1	KNG1			1,4	0.033		
9	P01042	Kininogen-1	KNG1	-1,5	0.035	1,5	0.023		
10	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA					3,1	0.011
11	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	A2GL	-1,8	0.018				
12	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	A2GL	-1,6	0.007				
13	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	A2GL					1,6	0.037
14	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	A2GL			2,3	0.041	2,9	0.01
15	P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1					2,7	0.047
16	P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1			2,5	0.016	2,1	0.033
17	P02743	Serum amyloid P-component	SAMP			1,5	0.01		
18	P04278	Sex hormone-binding globulin	SHBG	1,9	0.006				
19	-	No identificada						1,7	0.022
20	-	No identificada				1,6	0.007		
21	P36980	Complement factor H-related protein 2	FHR2	1,4	0.045				
22	-	No identificada				1,7	0.022	1,8	0.013
23	-	No identificada		-3,2	0.022				

**Tabla 5. Listado de las identificaciones de las 23 manchas proteicas diferencialmente expresadas en plasma mediante el experimento 2D-DIGE.** La tabla incluye el número de mancha proteica, el número de acceso en Uniprot, la abreviatura de la proteína, el cociente de variación (*average ratio*) entre los distintos grupos y los resultados estadísticos (*p*-valor) de la corrección de Tukey del análisis multivariante ANOVA. La escala de color representa: rojo, aumento; azul: disminución. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

## 1.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL MEDIANTE iTRAQ

Para llevar a cabo el análisis diferencial iTRAQ se realizó el marcaje isobárico de 24 muestras correspondientes a pacientes hipertensos con distinto grado de albuminuria (N, dnA y AM) y un grupo control comprendido de 8 individuos sanos. Debido a que el total de muestras eran 16 (4 réplicas por condición) se realizaron dos experimentos iTRAQ 8-plex. El diseño experimental del marcaje queda detallado en la Tabla 3 del apartado “Material y Métodos”.

El empleo de esta estrategia iTRAQ-LC-MS/MS ha permitido realizar un análisis a gran profundidad del proteoma del plasma, pudiéndose identificar un total de 4935 proteínas, de las cuales 36 se encontraron diferencialmente expresadas entre los distintos grupos de estudio. Además, es muy importante el destacar la identificación de 5 proteínas diferencialmente expresadas que no se habían detectado nunca en el plasma, ni en esta

## Resultados

patología (NALP9, UBP47, DNJC9, ORNT1 y CHADL) de acuerdo a las búsquedas realizadas en las bases de datos *Uniprot* y *The human protein atlas*. Se han considerado proteínas diferencialmente expresadas a aquellas identificadas con al menos dos péptidos y con valores de  $Zq \pm 2$  con  $p\text{-valor} \leq 0.05$ , siendo  $Zq$  la media de las cuatro réplicas comparada con el grupo de normoalbuminuria (Tabla 6).

Nº acceso (Uniprot)	Nombre proteína	Abreviatura	Nº de péptidos únicos	Zq (dnA/N)	Zq (AM/N)
P01876	<i>Ig alpha-1 chain C region</i>	IGHA1	26	6,92	1,97
P01860	<i>Ig gamma-3 chain C</i>	IGHG3	10	6,03	2,07
P01857	<i>Ig gamma-1 chain C</i>	IGHG1	15	5,93	2,36
P01877	<i>Ig alpha-2 chain C</i>	IGHA2	4	5,24	2,21
P01859	<i>Ig gamma-2 chain C</i>	IGHG2	5	5,17	2,12
P0CG05	<i>Ig lambda-2 chain C</i>	LAC2	6	4,69	1,3
B9A064	<i>Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5</i>	IGLL5	11	4,03	0,93
Q96K76	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47</i>	UBP47	2	3,65	0,41
P01834	<i>Ig kappa chain C</i>	IGKC	12	3,26	0,96
Q7RTR0	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 9</i>	NALP9	2	3,03	0,24
Q12756	<i>Kinesin-like protein KIF1A</i>	KIF1A	2	2,96	1,12
P80748	<i>Ig lambda chain V-III region LOI</i>	LV302	2	2,82	1,35
Q9Y619	<i>Mitochondrial ornithine transporter 1</i>	ORNT1	2	2,52	1,89
P00738	<i>Haptoglobin</i>	HPT	40	2,37	4,27
Q5VT25	<i>Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha</i>	MRCKA	3	2,29	0,24
Q70CQ4	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31</i>	USP31	2	2,23	1,59
P18031	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1</i>	PTPN1	2	2,09	0,79
Q6F5E8	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 16C</i>	RLTPR	2	2,08	0,11
Q00610	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	CLTC	4	2,06	2,56
Q8WXX5	<i>DnaJ homolog subfamily C member 9</i>	DNJC9	9	2,05	-0,19
Q8NCT1	<i>Arrestin domain-containing protein 4</i>	ARRDC4	2	1,34	2,11
P02656	<i>Apolipoprotein C-III</i>	APOC3	10	0,87	2,93
P02655	<i>Apolipoprotein C-II</i>	APOC2	11	0,62	2,93
P52945	<i>Pancreas/duodenum homeobox protein 1</i>	PDX1	4	-0,71	-4,02
P37837	<i>Transaldolase</i>	TALDO1	2	-0,72	-3
Q8IVF2	<i>Protein AHNK2</i>	AHNK2	5	-1,08	-2,24
P02763	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	ORM1	10	-1,115	3,323
Q15772	<i>Striated muscle preferentially expressed protein kinase</i>	SPEG	3	-2,26	-1,66
O60503	<i>Adenylate cyclase type 9</i>	ADCY9	2	-2,33	-3,03
Q6NUI6	<i>Chondroadherin-like protein</i>	CHADL	2	-2,38	-0,57
P20742	<i>Pregnancy zone protein</i>	PZP	66	-2,72	-1,46
H7C5R1	<i>Ceruloplasmin (Fragment)</i>	H7C5R1	12	-2,91	-1,05
P21108	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3</i>	PRPS1L1	2	-2,99	-0,15
P04279	<i>Semenogelin-1</i>	SEMG1	2	-3	-1,46
Q9Y2R2	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22</i>	PTPN22	2	-3,03	-1,24
P02787	<i>Serotransferrin</i>	TF	105	-3,45	-0,77

**Tabla 6. Listado de las proteínas diferencialmente expresadas en el experimento iTRAQ realizado en plasma deplecionado.** La tabla incluye el número de acceso en Uniprot, el nombre de la proteína, la abreviatura, el número de péptidos únicos con los que se ha identificado la proteína en cuestión y el valor de  $Zq$ , siendo la media de las 4 réplicas biológicas. La escala de color representa: rojo, aumento; azul: disminución. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

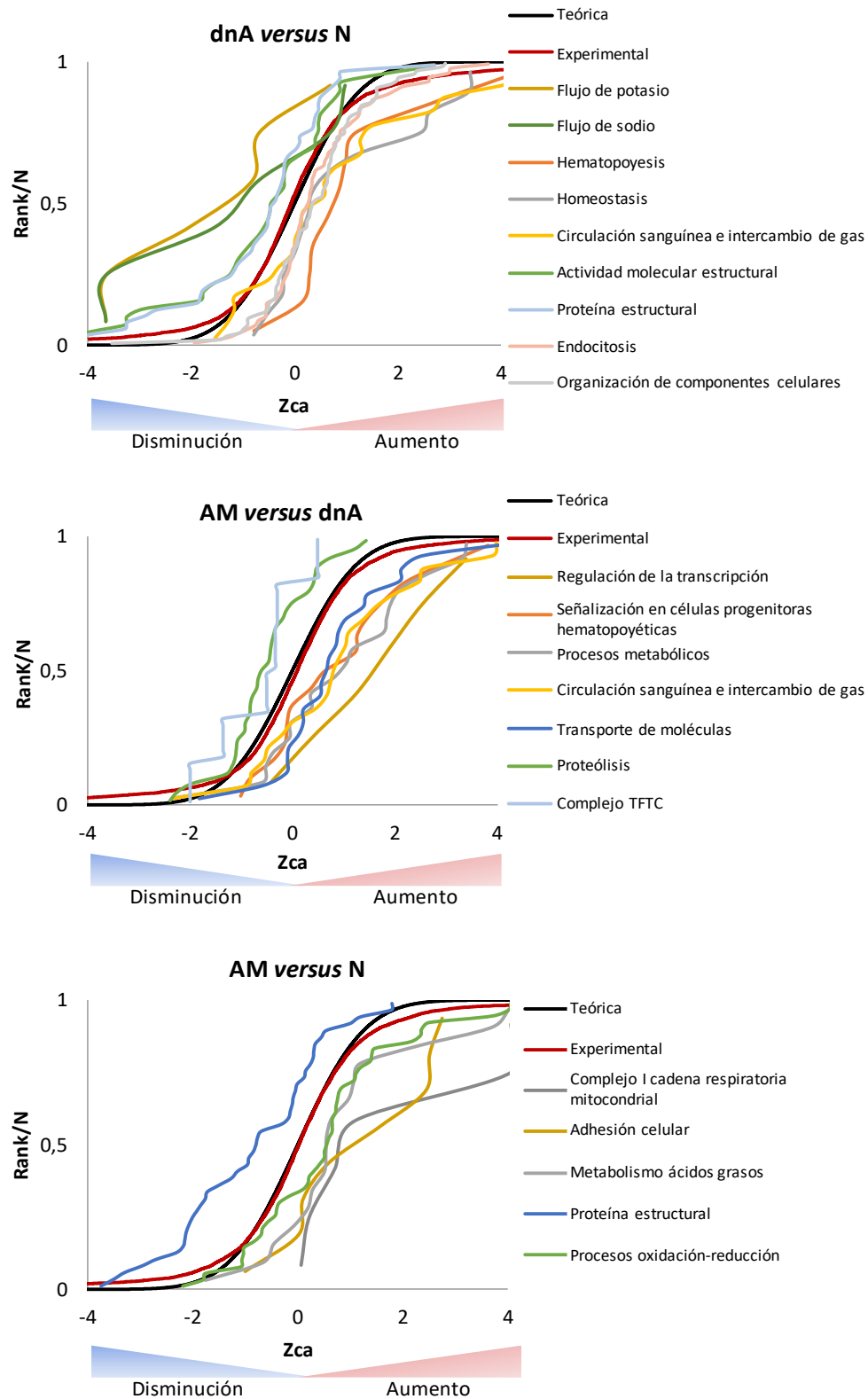


Además, se llevó a cabo un análisis de biología de sistemas mediante el algoritmo SBT del total de las proteínas identificadas con el fin de analizar las categorías funcionales que cambiaban entre los distintos grupos de estudio. Para ello, se han considerado categorías estadísticamente significativas aquellas formadas por 5 o más proteínas, con un valor de categoría  $Z_{ca} \pm 3$  y  $FDR \leq 0.05$  (Tabla 7 y Figura 23). Los análisis funcionales han permitido identificar 9 categorías que cambian en los pacientes dnA comparados con el grupo N, 4 de ellas se encuentran disminuidas (flujo de potasio y sodio, proteínas estructurales y actividad molecular estructural) y 5 categorías aumentadas (hematopoyesis, homeostasis, circulación sanguínea e intercambio de gas, endocitosis y organización de componentes celulares). En la comparación de pacientes AM y dnA aparecen 7 categorías funcionales diferenciales, 2 de ellas disminuidas (proteólisis y complejo TFRC) y 5 categorías aumentadas (señalización en células progenitoras hematopoyéticas, regulación de la transcripción, transporte de moléculas, procesos metabólicos y circulación sanguínea e intercambio de gas). Por último, en la comparativa AM frente a N se han encontrado 4 categorías diferenciales aumentadas (complejo I cadena respiratoria mitocondrial, procesos de oxidación-reducción, metabolismo de ácidos grasos y adhesión celular) y una categoría relacionada con proteína estructural disminuida.

## Resultados

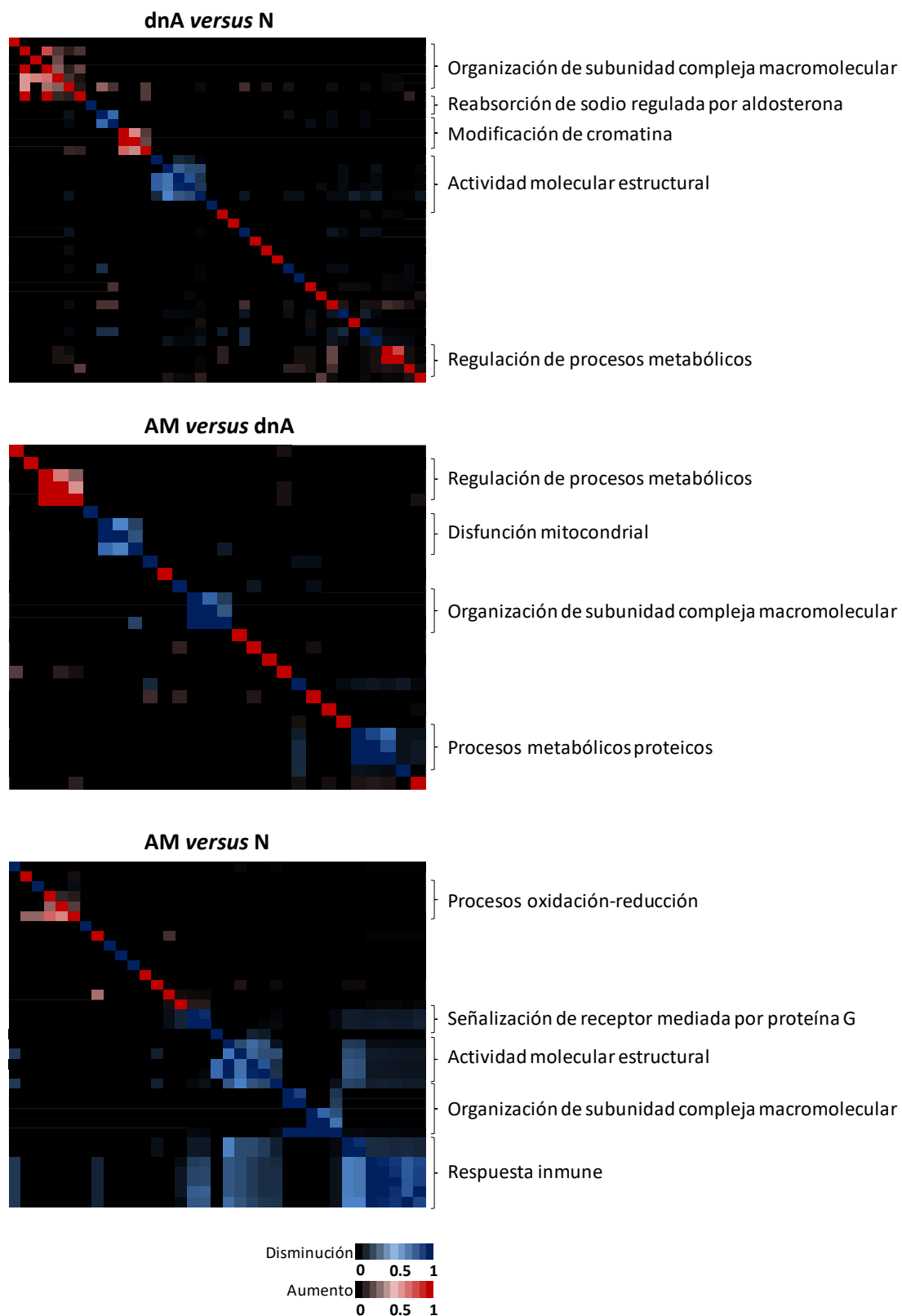
Categorías funcionales	Z ca	FDR ca
<b>dnA versus N</b>		
Proteína estructural	-4.474	>0.001
Flujo de potasio	-4.141	0.001
Actividad molecular estructural	-3.763	0.006
Flujo de sodio	-3.261	0.028
Hematopoyesis	3.246	0.029
Homeostasis	3.253	0.029
Circulación sanguínea e intercambio de gas	3.501	0.013
Endocitosis	3.714	0.007
Organización de componentes celulares	3.797	0.005
<b>AM versus dnA</b>		
Complejo TFRC	-4.778	>0.001
Proteólisis	-3.389	0.026
Señalización en células progenitoras hematopoyéticas	3.200	0.046
Regulación de la transcripción	3.502	0.019
Transporte de moléculas	3.530	0.017
Procesos metabólicos	3.672	0.011
Circulación sanguínea e intercambio de gas	3.801	0.007
<b>AM versus N</b>		
Proteína estructural	-6.744	>0.001
Complejo I cadena respiratoria mitocondrial	3.920	0.004
Procesos oxidación-reducción	3.282	0.030
Metabolismo de ácidos grasos	3.275	0.031
Adhesión celular	3.196	0.040

**Tabla 7. Listado de categorías funcionales compuestas de proteínas que cambian de una manera coordinada en los diferentes grupos de estudio.** N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.



**Figura 23. Representación gráfica de las categorías funcionales que cambian entre los distintos grupos de estudio.** Las curvas que representan la frecuencia acumulativa del cambio (Zca) aparecen representadas junto con la curva teórica mostrando una distribución normal de los datos. Además, la curva experimental representa el conjunto de todas las proteínas cuantificadas. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

Debido a que en el diseño jerárquico de las anotaciones funcionales algunas categorías comparten proteínas en común, se ha podido realizar un análisis de agrupación o *clusters* basados en la frecuencia de solapamiento de las proteínas que definen las categorías (Figura 24). En la comparación dnA frente a N, se han encontrado 5 *clusters* de categorías relacionadas con la organización de subunidad compleja macromolecular, reabsorción de sodio regulada por la aldosterona, modificación de la cromatina, actividad molecular estructural y regulación de los procesos metabólicos). En la comparativa AM frente a dnA, observamos 4 *clusters* de categorías (regulación de procesos metabólicos, disfunción mitocondrial, organización de la subunidad compleja macromolecular y procesos metabólicos proteicos). Para finalizar, en el grupo de AM comparado con el grupo N aparecen representados 5 *clusters* de proteínas relacionados con procesos de oxidación-reducción, señalización de receptores mediada por proteínas G, actividad molecular estructural, organización de la subunidad compleja macromolecular y respuesta inmune.



**Figura 24. Representación gráfica de las categorías funcionales diferenciales entre los distintos grupos de estudio estructuradas en grupos o *clusters*.** Se ha utilizado una escala de color para representar las categorías aumentadas en rojo y disminuidas en azul. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

### **1.3. CONFIRMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALES MEDIANTE SRM**

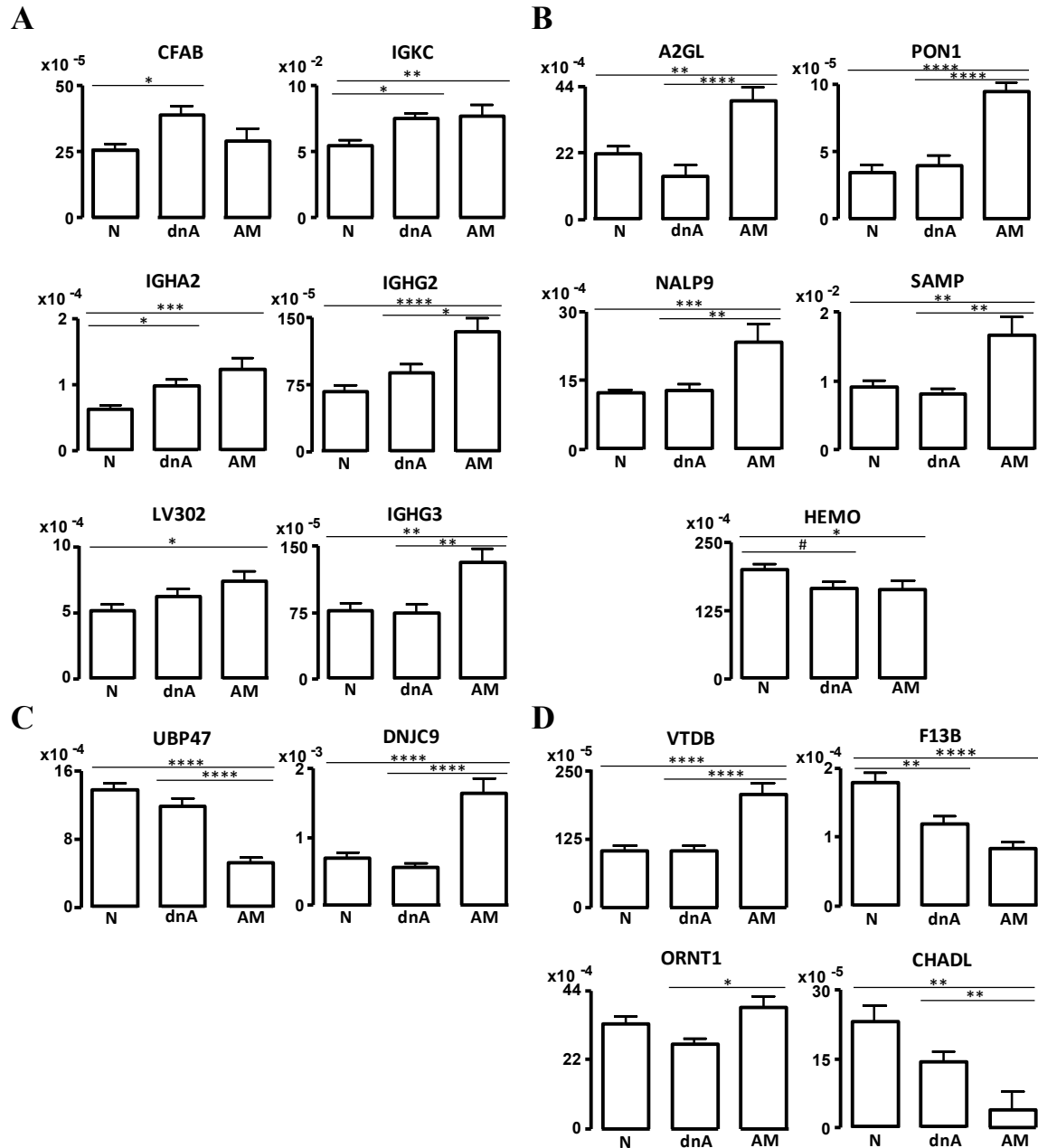
Para confirmar algunas de las proteínas diferencialmente expresadas en plasma tras los análisis 2D-DIGE e iTRAQ, se realizó un ensayo mediante SRM en una cohorte independiente de 105 pacientes (53 individuos N, 26 individuos dnA y 26 individuos AM), tanto en plasma completo como en plasma deplecionado. El análisis en ambos tipos de plasmas permitió corroborar que estas proteínas se detectaban también en plasma completo, potenciando el gran interés desde el punto de vista clínico debido a que en los laboratorios suele utilizarse plasma sin deplecionar. Estos pacientes fueron agrupados en 32 réplicas biológicas (N1-N15, dnA1-dnA9 y AM1-AM8) teniendo en cuenta sus características clínicas y niveles de albuminuria. En la Tabla 8 quedan recogidos todos los datos de las características clínicas y medicación de esta nueva cohorte de individuos.

## Resultados

Características basales	N (n=53)	dnA (n=26)	AM (n=26)	p-valor
Edad (años)	64 ± 11	69 ± 8	66 ± 11	0.264
Sexo (masculino), %	40	70	70	0.005
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 4	30 ± 5	30 ± 4	0.966
Fumador actual, %	9	15	11	0.743
Colesterol total (mg/dl)	186 ± 29	166 ± 26	168 ± 26	0.003
Triglicéridos (mg/dl)	123 ± 50	137 ± 36	131 ± 71	0.583
Colesterol HDL (mg/dl)	55 ± 12	50 ± 10	47 ± 13	0.018
Colesterol LDL (mg/dl)	106 ± 27	89 ± 19	97 ± 18	0.010
Glucemia (mg/dl)	118 ± 40	127 ± 26	118 ± 33	0.583
ACR (mg/g)	7.6 ± 6.7	116 ± 126	371 ± 573	<0.001
Aclaramiento de creatinina (mg/ml)	165 ± 38	87 ± 48	80 ± 39	0.405
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	81 ± 17	68 ± 20	67 ± 26	0.004
Ácido úrico (mg/dl)	5 ± 2	6 ± 2	7 ± 2	<0.001
Presión arterial sistólica (mmHg)	139 ± 18	136 ± 20	141 ± 28	0.663
Presión arterial diastólica (mmHg)	82 ± 11	80 ± 10	83 ± 14	0.761
Diabetes, %	38	62	54	0.107
<b>Medicación</b>				
Antihipertensivos, %				
IECA	20	30	30	0.737
ARB	80	70	70	0.737
Diurético	23	35	54	0.022
Antagonistas de los canales de calcio	47	46	61	0.428
Agente beta bloqueante	26	35	27	0.733
Agente alfa bloqueante	17	35	19	0.191
Otros tratamientos, %				
Agente anticoagulante	40	50	31	0.366
Agentes reductores de lípidos	74	69	81	0.627
Agente antidiabético	26	42	38	0.302

**Tabla 8. Características clínicas y medicación de la cohorte de pacientes utilizada en los análisis mediante SRM para la confirmación de las proteínas diferencialmente expresadas.** Los valores son expresados como la media ± desviación estándar o porcentajes. IMC: índice e masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; ACR: relación albúmina/creatinina; eGFR: tasa de filtrado glomerular estimado; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueantes de los receptores de angiotensina; N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AA: albuminuria mantenida.

Se analizaron mediante SRM 39 proteínas diferenciales que comprendían las 12 proteínas diferencialmente expresadas identificadas en el análisis 2D-DIGE y 27 diferenciales identificadas en el ensayo iTRAQ. Estas últimas fueron seleccionadas teniendo en cuenta tanto el valor de Zq como su implicación en los mecanismos moleculares relacionados con la patología. Un total de 17 proteínas fueron confirmadas en la cohorte independiente de 105 pacientes y agrupadas en función del proceso biológico en el que estaban implicadas (Figura 25).



**Figura 25. Confirmación de las 17 proteínas diferencialmente expresadas mediante el análisis SRM.** A) Panel de proteínas relacionadas con la respuesta del sistema inmune. B) Proteínas relacionadas con la inflamación. C) Proteínas relacionadas con el estrés del retículo endoplásmico y D) Proteínas implicadas en otras funciones. En los gráficos de barras se ha representado la transición del péptido más significativo. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida. \* $p$ -valor < 0.05, \*\* $p$ -valor < 0.01, \*\*\* $p$ -valor < 0.001, \*\*\*\* $p$ -valor < 0.0001, #  $p$ -valor = 0.051.

### Panel de proteínas identificadas en plasma con valor predictivo de albuminuria *de novo*

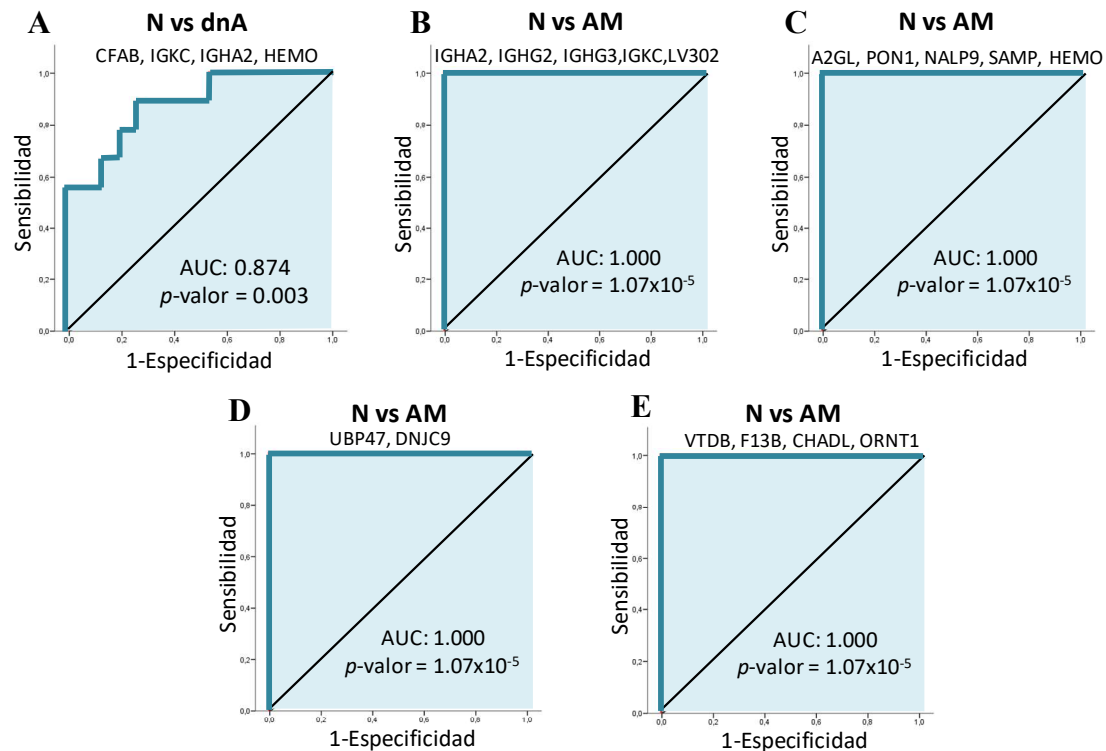
Los resultados mediante SRM en plasma de pacientes dnA mostraron un incremento en los niveles de expresión de 3 proteínas implicadas en la respuesta del sistema inmune (CFAB, IGKC e IGHA2) (Figura 25A) y una disminución de la proteína HEMO,



relacionada con los procesos inflamatorios (Figura 25D). Las curvas ROC para estas 4 proteínas muestran un valor de clasificación del panel estadísticamente significativo ( $p$ -valor = 0.003) en la discriminación de pacientes dnA respecto a los individuos N, con un AUC = 0.874 (Figura 26A).

### **Panel de proteínas plasmáticas marcadoras de albuminuria alta mantenida**

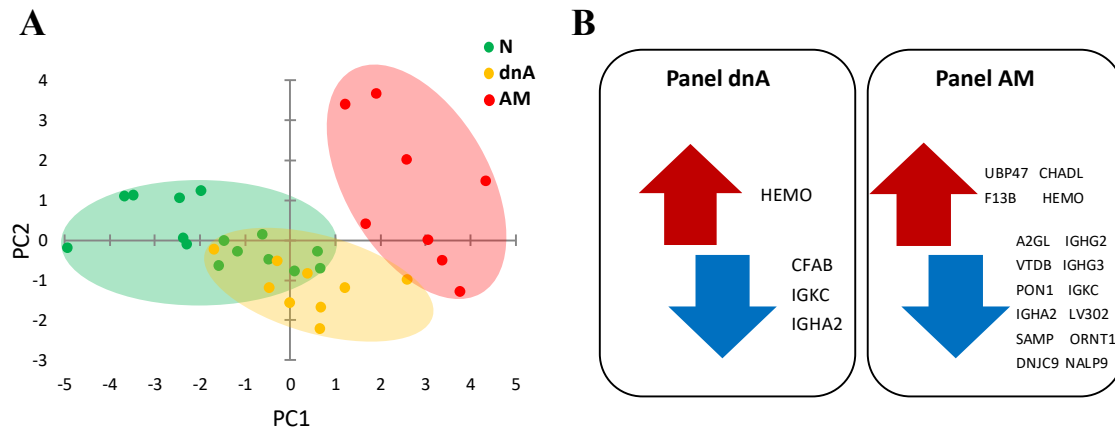
Los análisis de las proteínas confirmadas mediante SRM en plasma de pacientes con AM muestran un total de 5 proteínas diferencialmente expresadas (IGKC, LV302, IGHA2, IGHG2 e IGHG3) relacionadas con el sistema inmune (Figura 25A), dos de ellas (IGKC e IGHA2) estaban también alteradas en el grupo dnA. Además, se encontraron cambios de niveles de expresión en el grupo de AM en 5 proteínas relacionadas con la inflamación (A2GL, PON1, SAMP, NALP9 y HEMO) (Figura 25B), dos proteínas relacionadas con el estrés del retículo endoplásmico (UBP47 y DNJC9) (Figura 25C) y otras cuatro proteínas implicadas en diversas funciones tales como el transporte de vitamina D, coagulación, ciclo de la urea y diferenciación de condrocitos ((VTDB, ORNT1, F13B y CHADL, respectivamente) (Figura 25D). Los resultados de las curvas ROC mostraron una buena sensibilidad y especificidad (AUC = 1.000), lo que indica que estos perfiles proteómicos podrían discriminar pacientes AM de individuos N con un valor de clasificación estadísticamente significativo ( $p$ -valor =  $1.07 \times 10^{-05}$ ) (Figura 26B) y da mayor relevancia a los resultados obtenidos a partir de los análisis proteómicos.



**Figura 26.** Curvas ROC para la clasificación de pacientes con albuminuria *de novo* y mantenida frente a pacientes normoalbuminúricos. **A)** Proteínas con valor predictivo de albuminuria *de novo*. **B-E)** Proteínas marcadoras albuminuria alta sostenida implicadas en el sistema inmune (**B**), inflamación (**C**), estrés del retículo endoplásmico (**D**) y proteínas implicadas en otras funciones (**E**). Se consideraron estadísticamente significativas aquellas curvas con un área bajo la curva de un I.C. 95% y  $p\text{-valor} \leq 0.05$ . N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

Con el objetivo de visualizar si los diferentes grupos de estudio se agrupaban en función de los niveles de expresión de estas 17 proteínas confirmadas mediante SRM, se realizó un análisis de componentes principales. Como se puede observar en la Figura 27A, el grupo de pacientes AM queda separado del resto de los otros dos grupos de estudio.

En base a todos estos resultados, podemos afirmar que los análisis muestran dos paneles de proteínas diferenciales: 1) panel de marcadores candidatos de albuminuria *de novo*, formado por 4 proteínas y 2) panel de marcadores de daño orgánico crónico, formado de 16 proteínas (3 de ellas se encuentran alteradas también en el grupo dnA), cuyos niveles se encuentran alterados en los pacientes con albuminuria mantenida en el tiempo (Figura 27B).



**Figura 27. A)** Análisis de componentes principales de las 17 proteínas confirmadas mediante SRM donde se observa el agrupamiento de los distintos grupos de estudio. **B)** Dos paneles diferentes de proteínas en plasma, uno de albuminuria *de novo* y el segundo de albuminuria mantenida. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

Los resultados presentados en este apartado han dado lugar a una publicación en la revista *Hypertension*<sup>145</sup>.

#### 1.4. CONFIRMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALES MEDIANTE TURBIDIMETRÍA

Se seleccionaron un conjunto de 3 proteínas diferencialmente expresadas en plasma tras el análisis iTRAQ para ser confirmadas por turbidimetría en una cohorte independiente de 105 pacientes. Estas proteínas (haptoglobina (HPT), ceruloplasmina (CP) y alfa-1 glicoproteína ácida (ORM1)) se eligieron teniendo en cuenta la posible relevancia en la patología debido a su implicación en los procesos inflamatorios, así como también en procesos relacionados con fase aguda. En este caso, la clasificación de los pacientes se realizó teniendo en cuenta únicamente los valores de albuminuria (51 individuos N, 42 individuos con albuminuria alta (AA) y 12 individuos con albuminuria muy alta (AMA)). Las características basales y medicación de los pacientes quedan recogidas en la Tabla 9.

## Resultados

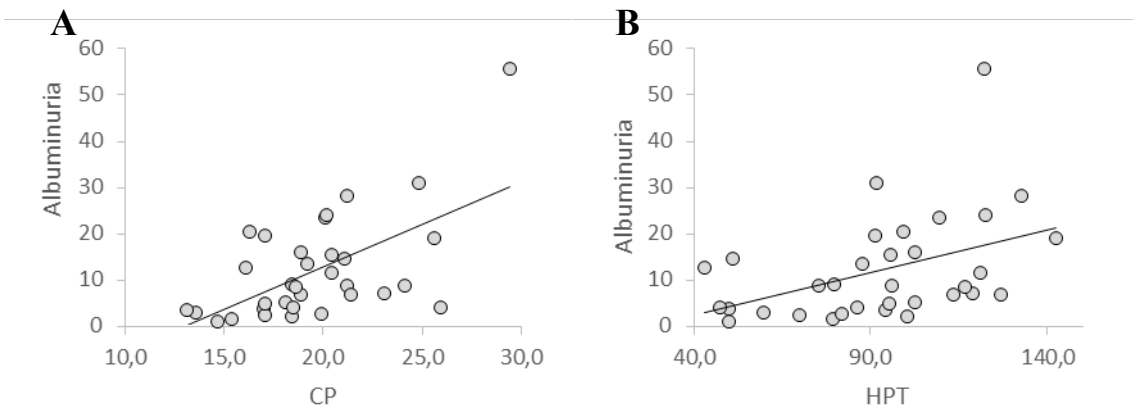
Características basales	N (n=51)	AA (n=42)	AMA (n=12)	p-valor
Edad (años)	64 ± 11	68 ± 9	69 ± 11	0.267
Sexo (masculino), %	39	64	83	0.005
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 4	31 ± 5	29 ± 4	0.406
Fumador actual, %	10	5	25	0.201
Colesterol total (mg/dl)	185 ± 30	169 ± 24	168 ± 27	0.016
Triglicéridos (mg/dl)	120 ± 52	134 ± 65	149 ± 68	0.259
Colesterol HDL (mg/dl)	54 ± 12	49 ± 12	47 ± 11	0.089
Colesterol LDL (mg/dl)	107 ± 28	94 ± 20	91 ± 17	0.023
Glucemia (mg/dl)	117 ± 40	126 ± 34	124 ± 21	0.481
Aclaramiento de creatinina (mg/ml)	162 ± 378	93 ± 36	70 ± 51	0.452
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	79 ± 20	73 ± 20	60 ± 27	0.017
Ácido úrico (mg/dl)	5.2 ± 1.7	6.3 ± 1.6	7.6 ± 1.9	<0.001
Presión arterial sistólica (mmHg)	140 ± 18	134 ± 18	144 ± 26	0.207
Presión arterial diastólica (mmHg)	81 ± 10	80 ± 10	83 ± 13	0.712
Diabetes, %	37	57	66	0.066
<b>Medicación</b>				
Antihipertensivos, %				
IECA	14	12	33	0.174
ARB	43	45	33	0.762
Diurético	22	43	50	0.041
Antagonistas de los canales de calcio	47	50	67	0.472
Agente beta bloqueante	32	26	25	0.824
Agente alfa bloqueante	20	24	25	0.855
Otros tratamientos, %				
Agente anticoagulante	45	33	42	0.511
Agentes reductores de lípidos	75	71	92	0.353
Agente antidiabético	25	38	50	0.188

**Tabla 9. Características clínicas y medicación de la cohorte de pacientes utilizada en los análisis mediante turbidimetría para la confirmación de 3 proteínas diferencialmente expresadas en el análisis diferencial iTRAQ.** Los valores son expresados como la media ± desviación estándar o porcentajes. IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; ACR: relación albúmina/creatinina; eGFR: tasa de filtrado glomerular estimado; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueantes de los receptores de angiotensina; N: normoalbuminuria; AA: albuminuria alta; AMA: albuminuria muy alta.

### Proteínas plasmáticas con valor predictivo de albuminuria *de novo*

Con el fin de comprobar si alguna de estas proteínas podría tener un valor predictivo del desarrollo de albuminuria, se realizaron análisis de correlaciones con los valores de albuminuria presentes en pacientes normoalbuminúricos no diabéticos (n = 33). Los resultados mostraron correlaciones positivas en las proteínas del plasma CP ( $r = 0.59$ ,  $p$ -valor = 0.0003) (Figura 28A) y HPT ( $r = 0.43$ ,  $p$ -valor = 0.011) (Figura 28B) frente a los niveles de albuminuria. Estos resultados vuelven a reforzar los resultados obtenidos mediante los análisis proteómico pudiéndose considerar ambas proteínas como

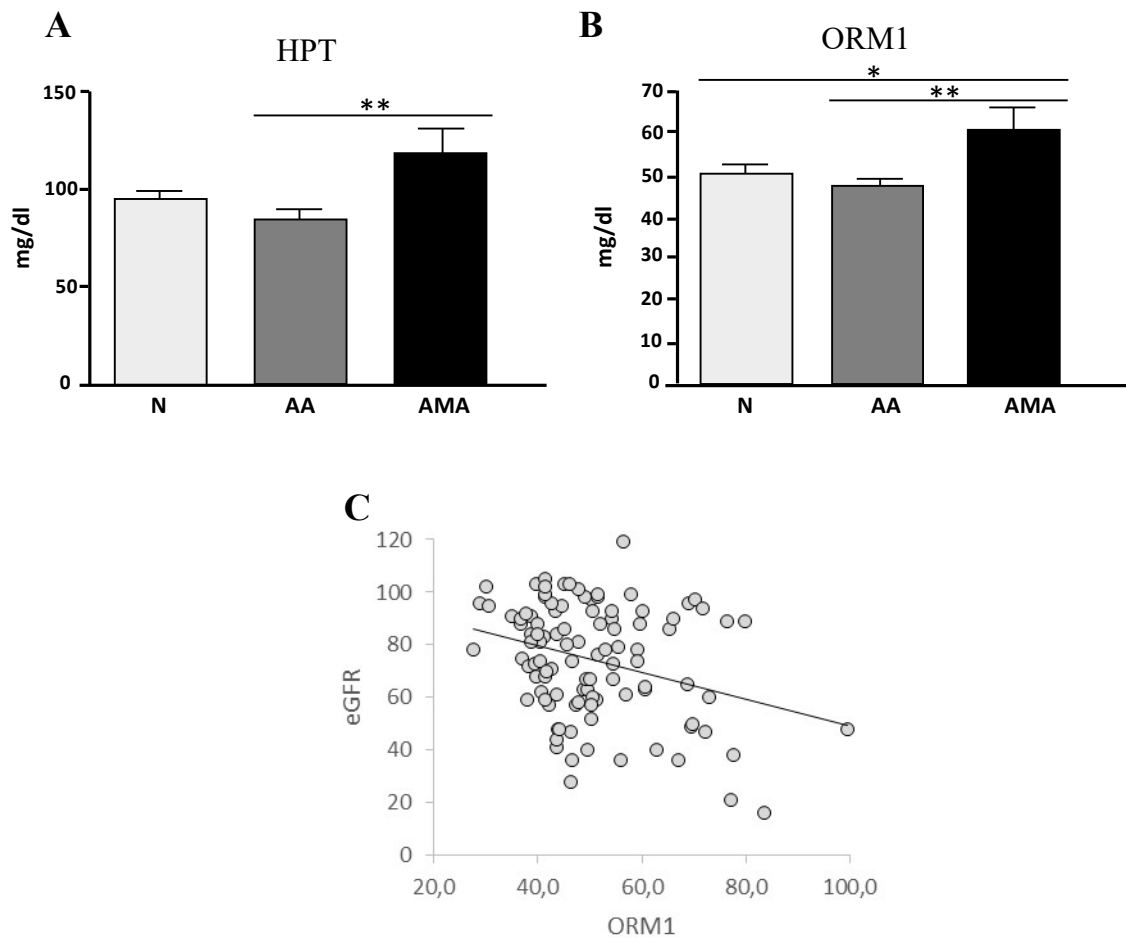
predictoras de desarrollo de albuminuria *de novo*, ya que al aumentar los niveles de albumina en orina aumentan los niveles de CP y HPT en sangre.



**Figura 28.** Correlaciones positivas de los niveles en plasma de CP (A,  $r=0,59$ ,  $p$ -valor  $<0,001$ ) y HPT (B,  $r=0,43$ ,  $p$ -valor  $<0,05$ ) con los valores de albuminuria en pacientes normoalbuminúricos no diabéticos ( $n = 33$ ). CP: ceruloplasmina; HPT: haptoglobina.

### Proteínas plasmáticas marcadoras de daño orgánico crónico

Los resultados de turbidimetría mostraron que los pacientes con albuminuria muy alta presentaban niveles aumentados en las proteínas del plasma HPT ( $p$ -valor = 0.007, AMA frente a AA) (Figura 29A) y ORM1 ( $p$ -valor = 0.028, AAM frente a N y  $p$ -valor = 0.004, AMA frente a AA) (Figura 29B). Además, se encontró una correlación negativa entre los niveles en plasma de ORM1 frente a los valores de eGFR en los 105 pacientes ( $r = -0.31$ ,  $p$ -valor = 0,001) (Figura 29C), lo que corrobora el potencial uso de esta proteína como marcador de daño orgánico crónico, ya que a menor filtrado glomerular mayor concentración de ORM1 en sangre.

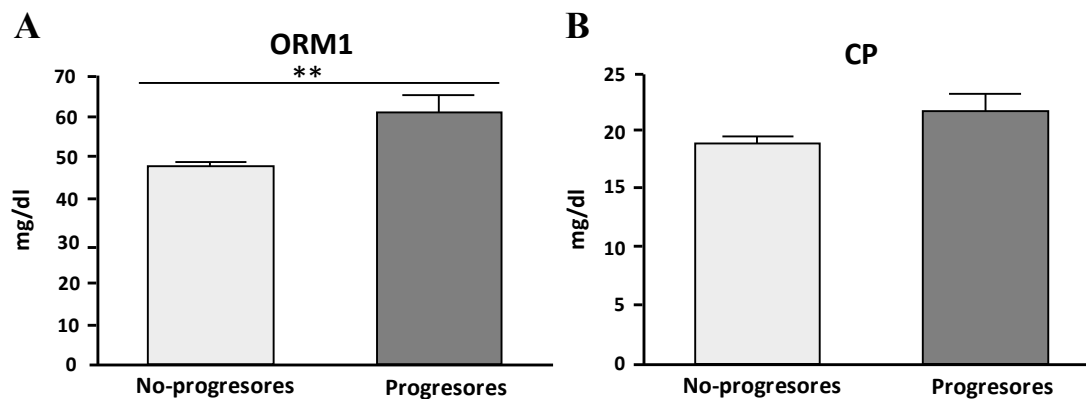


**Figura 29. Los niveles plasmáticos de HPT y ORM1 se postulan como posibles marcadores de daño renal crónico.** La determinación cuantitativa de los ensayos de turbidimetría de los niveles de HPT (**A**, ANOVA  $p$ -valor = 0,007 AMA frente a AA), ORM1 (**B**, ANOVA  $p$ -valor = 0.028 AMA frente a N y  $p$ -valor = 0,004 AMA frente a AA) y correlación de los niveles de ORM1 frente a eGFR en 105 pacientes (**C**,  $r = -0.31$ ,  $p$ -valor = 0.01). eGFR: tasa de filtrado glomerular estimado; HPT: haptoglobina; ORM1: alfa-1 glicoproteína ácida; N: normoalbuminuria; AA: albuminuria alta; AAM: albuminuria muy alta. \* $p$ -valor < 0.05, \*\* $p$ -valor < 0.01.

## 1.5. ESTUDIO PROSPECTIVO EN PLASMA DE PACIENTES NORMOALBUMINÚRICOS

Tras los resultados obtenidos mediante análisis proteómico se postularon una serie de proteínas como predictoras del desarrollo de albuminuria alta (CP y HPT). Se realizó un estudio prospectivo de la evolución de pacientes normoalbuminúricos tras dos años de seguimiento. Pasado este tiempo, se recogieron muestras de sangre de 52 pacientes que fueron clasificados en dos grupos en función del cambio de los niveles de albúmina en orina: a) pacientes que progresan a mayores valores de albúmina en orina (incremento

de ACR mayor de 10 mg en hombres y 15 mg en mujeres ( $n = 7$ ) y b) pacientes no progresores, cuyo cambio en los niveles de ACR no fue superior a 10/15 mg en hombres/mujeres, respectivamente ( $n = 45$ ). Tras los análisis mediante turbidimetría, se observó que en aquellos pacientes que progresaron a albuminuria había un incremento significativo en los niveles de ORM1 ( $p$ -valor = 0.003) (Figura 30A) y un incremento muy cercano a la significación en los niveles de CP ( $p$ -valor = 0.0507) (Figura 30B).



**Figura 30. Niveles en plasma de las proteínas ORM1 y CP con valor predictivo de progresión a albuminuria tras dos años de seguimiento.** Tras los análisis por turbidimetría, se encontraron niveles aumentados de ORM1 ( $p$ -valor = 0.0027) y CP ( $p$ -valor = 0.0507) en pacientes que progresaron a albuminuria (incremento de albúmina en orina mayor que 10 mg en hombres y 15 mg en mujeres,  $n = 7$ ) frente a pacientes que no progresaron ( $n = 45$ ). ORM1: alfa-1 glicoproteína ácida; CP: ceruloplasmina. \*\* $p$ -valor <0.01.

Los resultados de este trabajo han dado lugar a una publicación en la revista *International Journal of Cardiology*<sup>146</sup>.

## 2. ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN VEs DEL PLASMA DE PACIENTES HIPERTENSOS BAJO SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA CON DISTINTO GRADO DE DAÑO RENAL

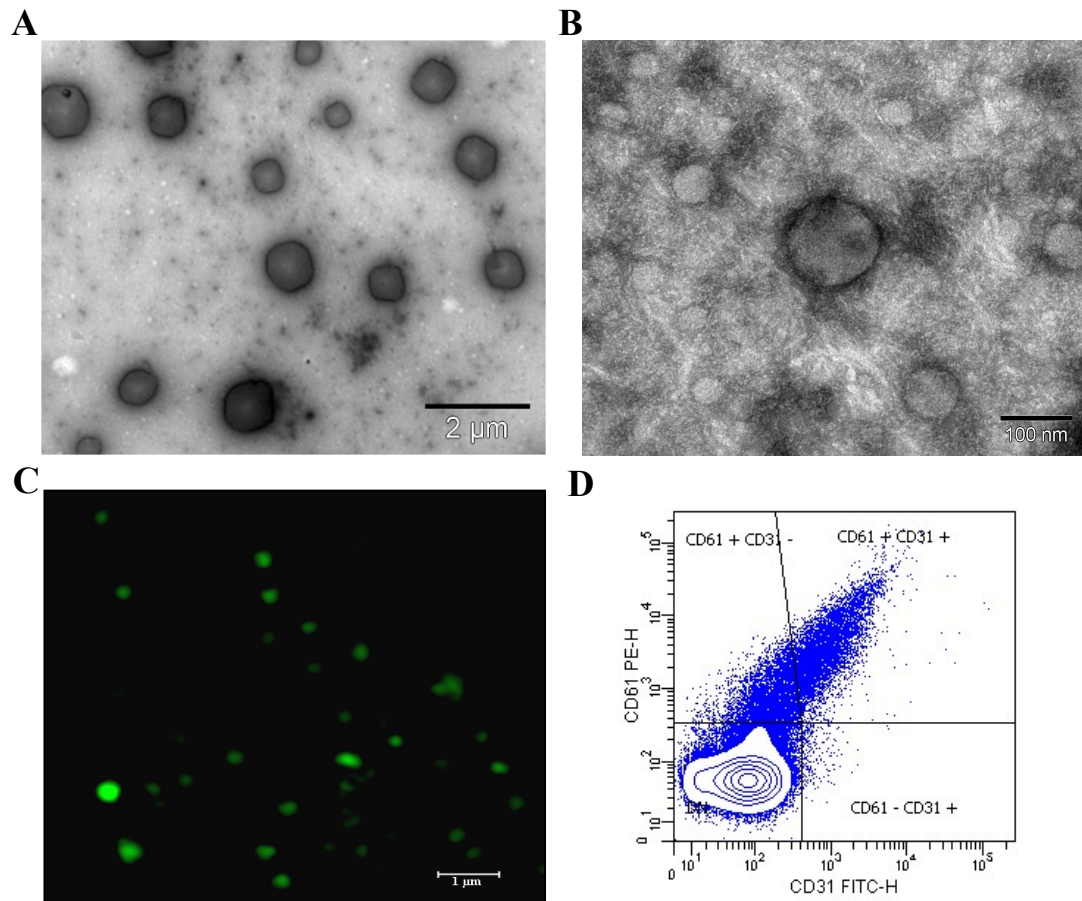
### 2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS VESICULAS EXTRACELULARES

Con el objetivo de verificar la eficiencia del método de aislamiento de las VEs del plasma tras los pasos de ultracentrifugación, se examinaron las VEs por microscopía electrónica, microscopía confocal y citometría de flujo.

Los resultados por microscopía electrónica muestran la presencia de vesículas de un tamaño entre 50 nm-1  $\mu$ m, que corresponden tanto a MVs como exosomas (Figura 31A y B). Además, los resultados de la inmunofluorescencia realizada para detectar la presencia de VEs que proceden de las plaquetas muestran que la gran mayoría de las

## Resultados

VEs aparecen marcadas con CD61 (Figura 31C). Los análisis mediante citometría de flujo nos permitió conocer los orígenes celulares de estas VEs circulantes en plasma: CD61 para VEs derivadas de plaquetas y CD31 para aquellas derivadas de células endoteliales. Debido al pequeño tamaño de estas VEs, se analizaron mediante *beads* (bolas) de calibrado lo que permitió definir una ventana de tamaño donde se encontraban estas VEs (Figura 31D).



**Figura 31. Caracterización de las VEs en plasma de pacientes hipertensos con supresión crónica del SRA. A-B)** Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica donde se observan la presencia de VEs del tamaño de 0.1-1 μm (MVes), a una resolución de 15000x, escala de 2 μm (A) y VEs con un tamaño entre 40-100 nm, correspondientes a exosomas (B), a una resolución de 200000x y escala de 100nm. **C)** Los análisis mediante microscopía confocal con el marcaje CD61 permitió comprobar la presencia de MVes derivadas de plaquetas (aceite de inmersión, objetivo 63x, zoom 1.4) y escala de 1 μm. **D)** Análisis de citometría de flujo donde se definió una ventana para las VEs utilizando unas bolas fluorescentes (Megamix). En el gráfico se observa la expresión en VEs de CD61<sup>+</sup> (derivadas de plaquetas) y CD61<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> (derivadas de células endoteliales).



## 2.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL MEDIANTE iTRAQ

En este estudio se analizaron mediante análisis diferencial iTRAQ las VEs del plasma de 22 pacientes hipertensos con distinto grado de daño renal (8 individuos N, 7 individuos dnA y 7 individuos AM). Estos pacientes fueron agrupados en 4 réplicas biológicas de cada grupo (N1-N1, dnA1-dnA4 y AM1-AM4). Para llevar a cabo el marcaje de las muestras, se realizaron dos experimentos iTRAQ y en cada uno de ellos se incluyó dos muestras de referencia cada una compuesta de una mezcla de 4 muestras de individuos sanos, con el fin de normalizar las cuantificaciones entre las muestras de los experimentos. El diseño experimental del marcaje queda detallado en la Tabla 3 del apartado “Material y Métodos”. Las características clínicas y medicación de los individuos utilizados en este análisis quedan recogidos en la Tabla 10.

Características basales	N (n=8)	dnA (n=7)	AM (n=7)	p-valor
Edad (años)	62 ± 6	63 ± 11	62 ± 10	0.79
Sexo (masculino), %	50	70	70	0.6
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 4	32 ± 4	30 ± 5	0.96
Fumador actual, %	0	0	30	0.09
Colesterol total (mg/dl)	194 ± 27	159 ± 16	188 ± 43	0.046
Triglicéridos (mg/dl)	86 ± 22	93 ± 30	182 ± 43	0.089
Colesterol HDL (mg/dl)	56 ± 14	48 ± 8	47 ± 11	0.19
Colesterol LDL (mg/dl)	121 ± 28	92 ± 15	108 ± 31	0.04
Glucemia (mg/dl)	100 ± 15	101 ± 16	106 ± 31	0.54
Aclaramiento de creatinina (mg/ml)	88 ± 22	114 ± 50	84 ± 43	0.48
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	83 ± 13	68 ± 23	67 ± 28	0.29
Ácido úrico (mg/dl)	4.6 ± 1.1	6 ± 2	6 ± 2	0.18
Presión arterial sistólica (mmHg)	126 ± 9	136 ± 24	124 ± 13	0.95
Presión arterial diastólica (mmHg)	75 ± 10	81 ± 4	75 ± 11	0.93
<b>Medicación</b>				
Antihipertensivos, %				
IECA	12	12	0	0.58
ARB	88	88	100	0.58
Diurético	88	57	72	0.74
Antagonistas de los canales de calcio	75	63	15	0.13
Agente beta bloqueante	25	29	29	0.98
Agente alfa bloqueante	13	14	14	0.3
Otros tratamientos, %				
Agente anticoagulante	0	29	29	0.24
Agentes reductores de lípidos	88	72	57	0.41
Agente antidiabético	0	14	0	0.32

**Tabla 10. Características clínicas y medicación de la población de estudio utilizada en el análisis diferencial de VEs del plasma mediante iTRAQ.** Los valores son expresados como la media ± desviación estándar o porcentajes. IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; ACR: relación albúmina/creatinina; eGFR: tasa de filtrado glomerular estimado; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueantes de los receptores de angiotensina; N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

## Resultados

Los resultados del análisis diferencial mostraron un total de 2463 proteínas identificadas en las VEs del plasma, de ellas, 20 se encontraron diferencialmente expresadas en los distintos grupos de estudio. Además, se realizó una búsqueda de todas las proteínas en dos bases de datos: *Vesiclepedia* y *EVpedia* para comprobar que existían evidencias previas de la expresión de estas proteínas en las VEs, tanto en MVs como en exosomas (Tabla 11). Del total de las proteínas, 14 habían sido descritas previamente en VEs a nivel de proteína mientras que un conjunto de 4 proteínas (*MAGUK p55 subfamily member 4*, *MPP4*; *ORM1-like protein 2*, *ORML2*; *CHD7*; and *XK-related protein 3*) sólo mostraron evidencias de su expresión a nivel de mRNA. Además, las proteínas *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* CYLD y *biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1* no se habían asociado previamente a las VEs. Como conclusión podemos decir que estos resultados han puesto de manifiesto la existencia de 6 proteínas en las VEs del plasma, cuya evidencia no había sido descrita previamente.

Nº acceso (Uniprot)	Nombre proteína	Abreviatura	Zq (dnA/N)	Zq (AM/N)	Zq (AM/dnA)	Evidencia bases datos
Q96JB8	<i>MAGUK p55 subfamily member 4</i>	MPP4	-3,59	-1,64	1,94	MV; mRNA
P00738	<i>Haptoglobin</i>	HPT	-2,17		2,79	MV. E; Proteína
P00739	<i>Haptoglobin-related protein</i>	HPTR	-1,59			MV. E; Proteína
P01625	<i>Ig kappa chain V-IV region Len</i>	KV402	-2,73	-1,88		MV; Proteína
P06312	<i>Ig kappa chain V-IV region (Fragment)</i>	KV401	-2,06			MV; Proteína
Q17RY0	<i>Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4</i>	CPEB4	-1,74	-1,75		MV; Proteína
Q15485	<i>Ficolin-2</i>	FCN2	-1,55			MV. E; Proteína
P68871	<i>Hemoglobin subunit beta</i>	HBB		-2,88	-1,72	MV. E; Proteína
P01860	<i>Ig gamma-3 chain C region</i>	IGHG3			-2,29	MV. E; Proteína
Q5S007	<i>Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2</i>	LRRK2	1,68	2,15		MV. E; Proteína
O600229	<i>Kalirin</i>	KALRN	1,88			MV. E; Proteína
Q53FV1	<i>ORM1-like protein 2</i>	ORML2	2			MV; mRNA
Q9BXXO	<i>EMILIN-2</i>	EMIL2	2,17			MV; Proteína
Q9P2D1	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7</i>	CHD7	2,62			MV; mRNA
Q9NQC7	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. CYLD</i>	CYLD	2,63	2,61		-
Q8NFC6	<i>Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1</i>	BD1L1			-1,86	-
P01833	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	PIGR	-2,05	-1,6		MV. E; Proteína
P01871	<i>Ig mu chain C region</i>	IGHM	-1,91			MV. E; Proteína
Q56H77	<i>XK-related protein 3</i>	XKR3	1,57			MV; mRNA
Q6N022	<i>Teneurin-4</i>	TEN4	2,8		-1,63	MV. E; Proteína

**Tabla 11. Listado de las proteínas diferencialmente expresadas en el experimento iTRAQ de VEs plasmáticas.** La tabla incluye el número de acceso en Uniprot, el nombre de la proteína, la abreviatura, el valor de Zq, siendo la media de las 4 réplicas biológicas y la evidencia en bases de datos (*EVpedia* y *Vesiclepedia*) de la expresión de estas proteínas en VEs a nivel molecular (proteínas o mRNA). MV: microvesículas; E: exosomas; N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

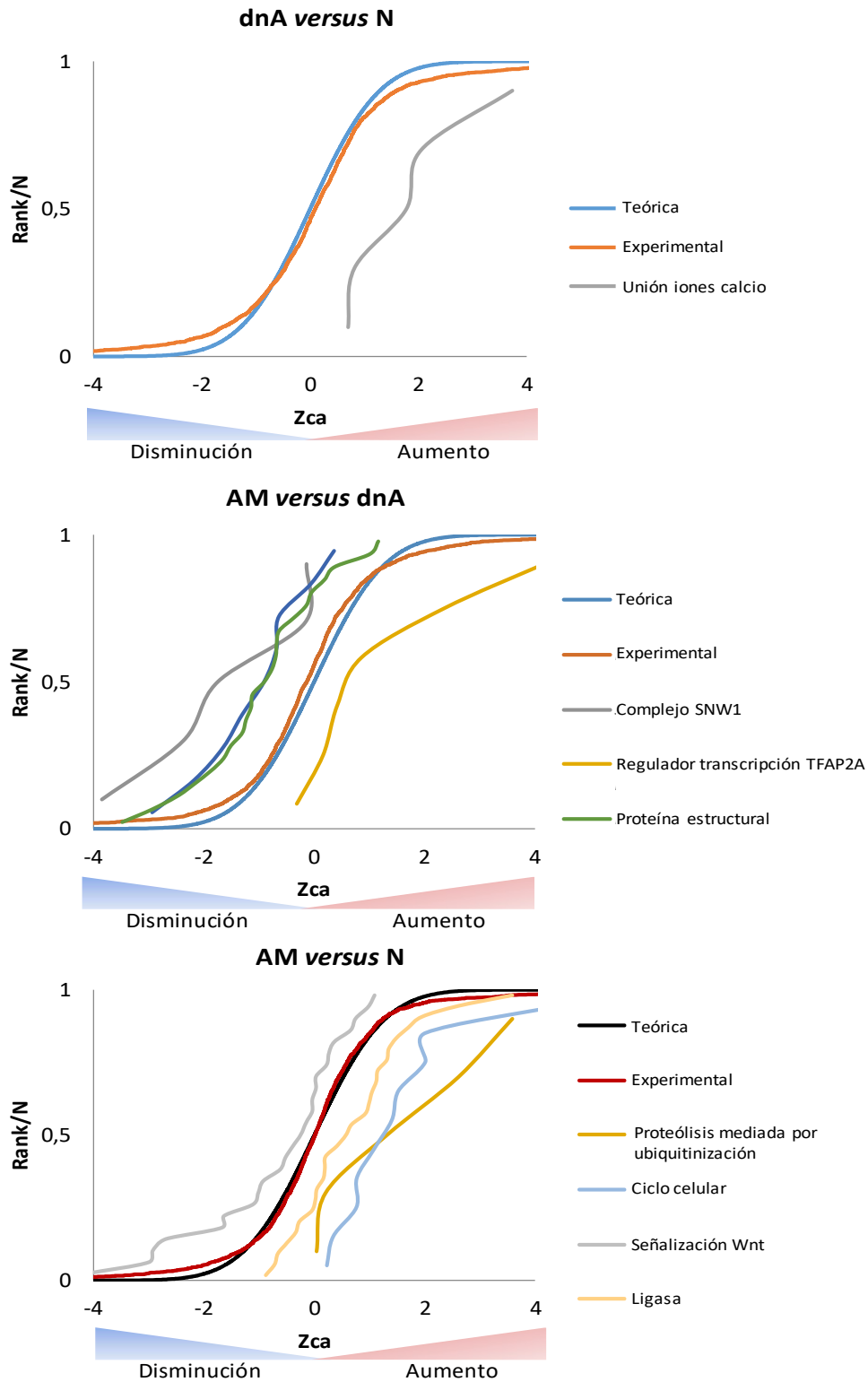
Los análisis de la biología de sistemas mediante el algoritmo SBT mostraron aquellas categorías funcionales que cambiaban entre los diferentes grupos de estudio (Tabla 12 y Figura 32). Como podemos observar en la comparativa de pacientes dnA frente a N

## Resultados

únicamente cambia la categoría de unión de iones calcio, mientras que en la comparativa de individuos AM frente a dnA aparece aumentada una categoría funcional definida como regulador de la transcripción TFAP2A y disminuidas las categorías de proteína estructural y complejo SNW1. Por último, en la comparación correspondiente a los individuos AM frente N aparecen aumentadas las categorías funcionales relacionadas con el ciclo celular, proteólisis mediada por ubiquitinización y ligasa y disminuida la categoría denominada señalización Wnt.

Categorías funcionales	Z ca	FDR ca
<b>dnA versus N</b>		
Unión iones calcio	3.513	0.008
<b>AM versus dnA</b>		
Proteína estructural	-4.104	0.003
Regulador transcripción TFAP2A	3.587	0.018
Complejo SNW1	-3.310	0.039
<b>AM versus N</b>		
Ciclo celular	4.492	>0.001
Señalización Wnt	-3.615	0.018
Proteólisis mediada por ubiquitinización	3.370	0.036
Ligasa	3.276	0.047

**Tabla 12. Listado de categorías funcionales compuestas de proteínas que cambian de una manera coordinada en los diferentes grupos de estudio.** N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.



**Figura 32. Representación gráfica de las categorías funcionales que cambian entre los distintos grupos de estudio.** Las curvas que representan la frecuencia acumulativa del cambio (Zca) aparecen representadas junto con la curva teórica mostrando una distribución normal de los datos. Además, la curva experimental representa el conjunto de todas las proteínas cuantificadas. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida

### 2.3. CONFIRMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALES MEDIANTE SRM

Para confirmar algunas de las proteínas diferencialmente expresadas en las VEs del plasma a través del análisis diferencial iTRAQ, se realizó un ensayo mediante SRM utilizando una cohorte independiente de 99 pacientes. Esta nueva cohorte de individuos está formada por 50 pacientes N y 49 pacientes con albuminuria (25 dnA y 24 AM). Los individuos se agruparon en 34 réplicas biológicas (N1-N14, dnA1-dnA11 y AM1-AM9) teniendo en cuenta sus características clínicas y niveles de albuminuria. Las características clínicas y medicación de estos individuos quedan detallados a continuación (Tabla 13).

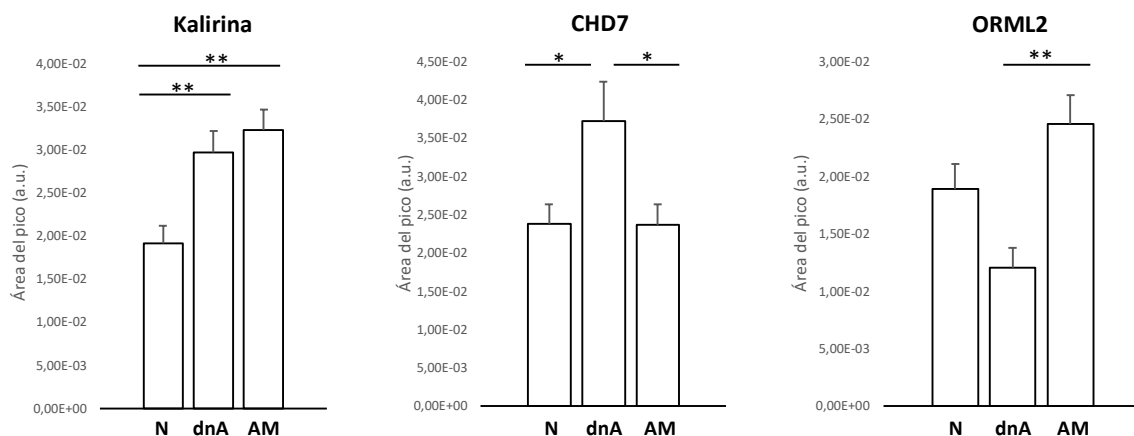
Características basales	N (n=50)	dnA (n=25)	AM (n=24)	p-valor
Edad (años)	65 ± 11	68 ± 8	64 ± 12	0.23
Sexo (masculino), %	38	64	67	0.024
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 4	29 ± 5	30 ± 4	0.6
Fumador actual, %	10	20	13	0.48
Colesterol total (mg/dl)	186 ± 29	165 ± 26	174 ± 28	0.007
Triglicéridos (mg/dl)	123 ± 51	140 ± 66	141 ± 71	0.38
Colesterol HDL (mg/dl)	54 ± 12	51 ± 13	47 ± 14	0.06
Colesterol LDL (mg/dl)	107 ± 28	86 ± 17	101 ± 21	0.002
Glucemia (mg/dl)	120 ± 41	128 ± 26	118 ± 34	0.57
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	99 ± 41	86 ± 46	75 ± 37	0.017
Ácido úrico (mg/dl)	5 ± 2	6 ± 2	7 ± 2	0.0003
Presión arterial sistólica (mmHg)	138 ± 17	136 ± 17	142 ± 29	0.64
Presión arterial diastólica (mmHg)	81 ± 11	81 ± 11	84 ± 15	0.69
<b>Medicación</b>				
Antihipertensivos, %				
IECA	14	16	20	0.80
ARB	86	84	80	0.80
Diurético	46	60	67	0.2
Antagonistas de los canales de calcio	64	60	75	0.51
Agente beta bloqueante	26	32	30	0.86
Agente alfa bloqueante	18	32	17	0.31
Otros tratamientos, %				
Agente anticoagulante	40	48	25	0.24
Agentes reductores de lípidos	74	76	84	0.67
Agente antidiabético	28	46	28	0.36

**Tabla 13. Características clínicas y medicación de la cohorte de pacientes utilizada en los análisis mediante SRM para la confirmación de las proteínas diferencialmente expresadas en las VEs del plasma mediante iTRAQ.** Los valores son expresados como la media ± desviación estándar o porcentajes. IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; ACR: relación albúmina/creatinina; eGFR: tasa de filtrado glomerular estimado; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueantes de los receptores de angiotensina; N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

## Resultados

Se analizaron las proteínas Kalirina, CHD7 y ORML2 junto con la proteína E-Selectina (CD62), marcador de CEs activadas. Los resultados de las cuantificaciones mediante SRM confirmaron los niveles aumentados de estas 3 proteínas en pacientes con albuminuria alta (Figura 33). Las proteínas Kalirina ( $p$ -valor = 0.0064) y CHD7 ( $p$ -valor = 0.0282) mostraron un incremento estadísticamente significativo en pacientes dnA frente a individuos N. En el caso de la kalirina, se incrementó de manera similar en pacientes AM ( $p$ -valor = 0.0014) comparado con N, mientras que los niveles de CHD7 en pacientes AM eran muy parecidos a los individuos N. Además, se observó un incremento en la proteína ORML2 en pacientes AM comparados con dnA ( $p$ -valor = 0.0014).

Los análisis de correlaciones entre las proteínas diferenciales frente al marcador CD62E mostraron dos correlaciones positivas estadísticamente significativas en las proteínas kalirina ( $r = 0.59$ ,  $p$ -valor =  $5.96 \times 10^{-11}$ ) y CHD7 ( $r = 0.52$ ,  $p$ -valor =  $3.02 \times 10^{-8}$ ). Estos datos ponen de manifiesto el posible papel de ambas proteínas en la activación de las CEs dentro de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, los niveles de estas proteínas en las VEs circulantes del plasma podrían ser marcadores de disfunción endotelial en pacientes hipertensos con albuminuria.



**Figura 33. Confirmación de 3 proteínas diferencialmente expresadas en las VEs del plasma mediante la técnica SRM.** La cuantificación de kalirina, CHD7 y ORML2 se llevó a cabo en una cohorte independiente de 99 individuos: 50 pacientes N, 25 pacientes dnA y 24 pacientes AM. En los gráficos de barras se ha representado la transición del péptido más significativo. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida. \* $p$ -valor < 0.05, \*\* $p$ -valor < 0.01.

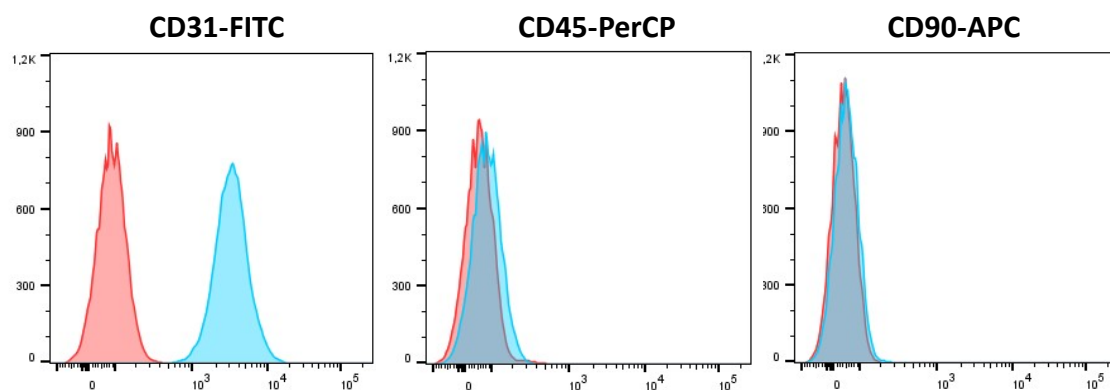
### 3. ANÁLISIS IN VITRO DE LA EXPRESIÓN DE KALIRINA Y CHD7 EN CEs TRATADAS CON TNF- $\alpha$

Para estudiar el posible papel de las proteínas Kalirina y CHD7 en la disfunción endotelial, se realizó un ensayo *in vitro* en CEs aisladas de una vena safena de humano adultotratadas con TNF- $\alpha$ . Estos cultivos primarios aislados de los vasos sanguíneos de adulto presentan una mayor ventaja respecto a las CEs de la vena umbilical humana (HUVECs), comúnmente utilizadas en este tipo de estudios.

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO ENDOTELIAL

##### 3.1.1. Citometría de flujo

El linaje endotelial de estas células se confirmó mediante citometría de flujo analizando la expresión de los siguientes marcadores de superficie: CD31 (marcador endotelial), CD90 (marcador de células mesenquimales y fibroblastos) y CD45 (marcador de células hematopoyéticas). Como se muestra en la Figura 34, el análisis de los marcadores del fenotipo endotelial mostró la expresión positiva de CD31 y expresión negativa de CD45 y CD90.



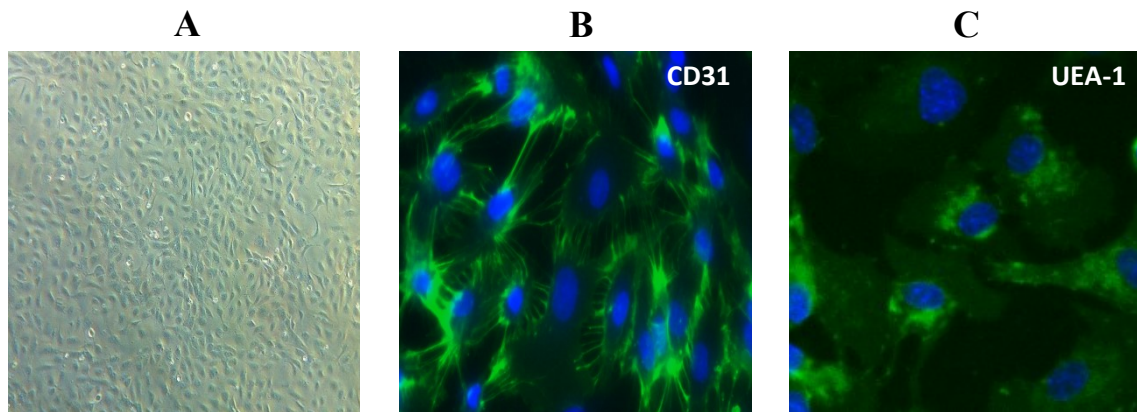
**Figura 34. Caracterización fenotípica del linaje endotelial mediante citometría de flujo.** En los histogramas de color azul se representa la expresión de CD31<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD90<sup>-</sup>. Los histogramas de los controles isotípicos quedan representados en color rojo.

##### 3.1.2. Microscopía confocal

Mediante la visualización de los cultivos de CEs en el microscopio de contraste de fase (Leica), se pudo observar que las células mostraban la clásica morfología adoquinada del fenotipo endotelial (Figura 35A) y mantuvieron las mismas características morfológicas durante todo el tiempo que estuvieron las células en cultivo. Además, los

## Resultados

resultados de las inmunofluorescencias mediante el marcaje de CEs con marcadores característicos del linaje endotelial mostraron la expresión positiva de CD31 en la superficie de las células (Figura 35B) así como también la expresión positiva de UEA-1 en el citoplasma (Figura 35D), verificando nuevamente el fenotipo endotelial de estas células.



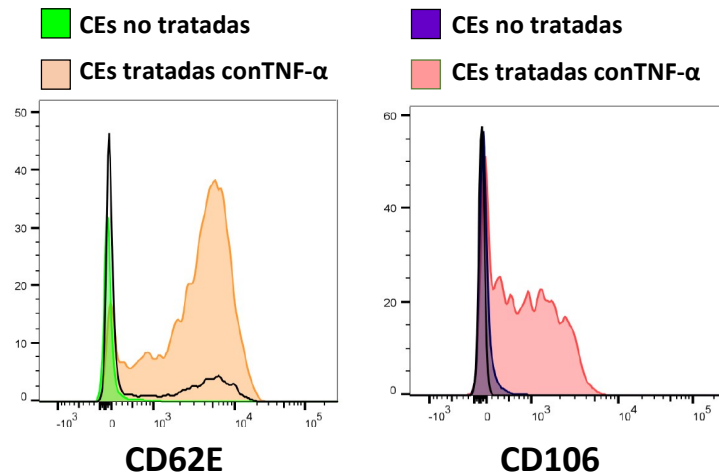
**Figura 35. Aislamiento de CE a partir de la vena safena humana de adulto.** A) Las CE se observaron mediante un microscopio de contraste de fase donde podemos observar la monocapa de células confluyente con morfología adoquinada. B-C) Inmunofluorescencia indirecta de las CE donde se muestra la expresión de CD31 en la superficie celular (B) y la expresión de UEA-1 en el citoplasma (C). El núcleo de las células se tiñó con DAPI.

## 3.2. EXPRESIÓN DE KALIRINA Y CHD7 EN CE<sub>s</sub> ACTIVADAS

### 3.2.1. Citometría de flujo

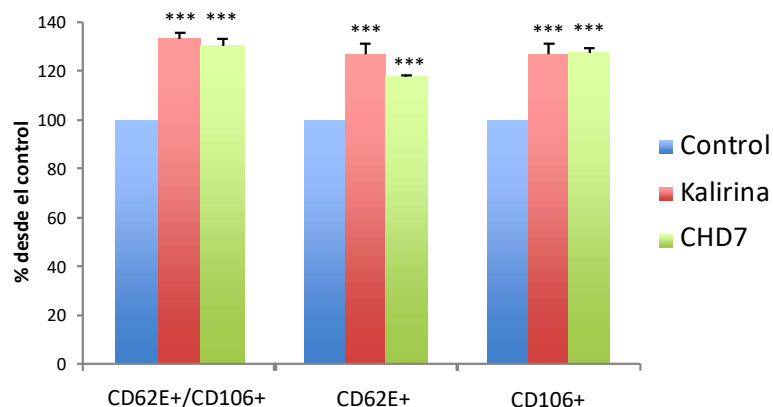
Los resultados mediante citometría de flujo mostraron un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión vascular (E-Selectina y VCAM-1) en CE<sub>s</sub> expuestas a la citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 5 horas) comparadas con las células no tratadas (control negativo) (Figura 36).





**Figura 36. Análisis *in vitro* de la sobreexpresión de moléculas de adhesión vascular E-Selectina y VCAM-1 en respuesta al TNF- $\alpha$ .** Los análisis por citometría de flujo muestran el incremento de expresión de los marcadores de activación CD62E y CD106 en células tratadas con TNF- $\alpha$  respecto al grupo control. En el caso de la expresión del marcador CD62E, el histograma de color naranja representa las CEs estimuladas con TNF- $\alpha$  mientras que el histograma verde representa las CEs no tratadas, utilizadas como control. En cuanto a la proteína CD106, en rosa aparece representado el histograma correspondiente a las CEs tratadas con TNF- $\alpha$  y en color morado las CEs no tratadas. CD62E: E-Selectina; CD106: VCAM-1.

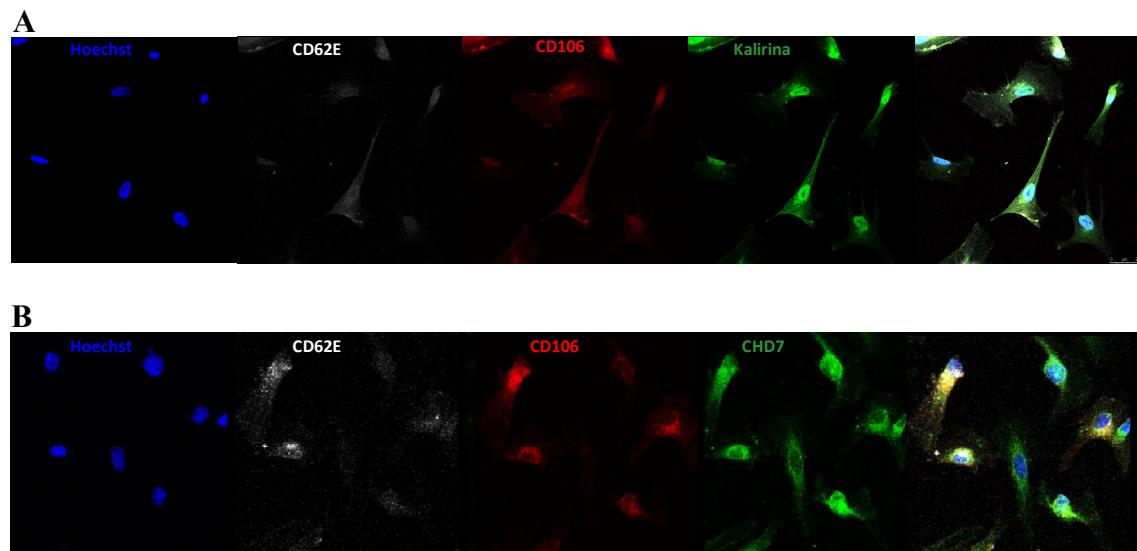
Como podemos ver en la Figura 37, tras los análisis por citometría de flujo se observó que las CEs tratadas con TNF- $\alpha$  (CD62E<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup> y CD62E<sup>+</sup>/CD106<sup>+</sup>) mostraron un incremento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de Kalirina y CHD7 ( $p$ -valor < 0.001) respecto a las células doble negativas (CD62E<sup>-</sup>/CD106<sup>-</sup>).



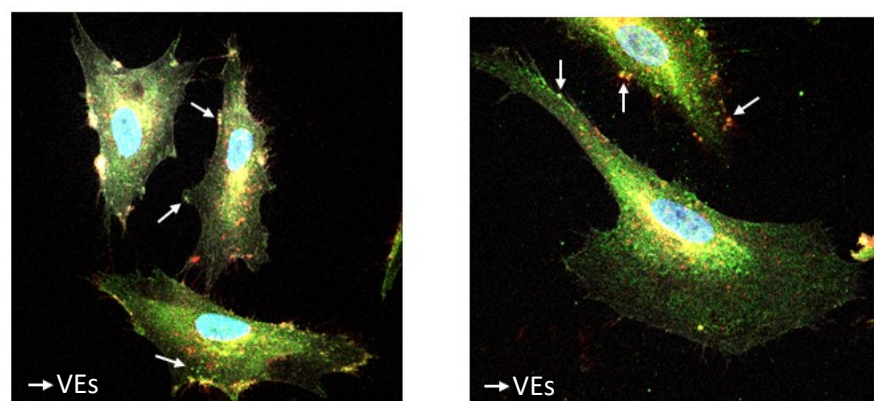
**Figura 37. Expresión de kalirina y CHD7 en células activadas con TNF- $\alpha$ .** Los análisis mediante citometría de flujo de CEs activadas (CD62E<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup> y CD62E<sup>+</sup>/CD106<sup>+</sup>) mostraron un incremento estadísticamente significativo de las proteínas kalirina y CHD7 respecto a las CEs doble negativas (CD62E<sup>-</sup>/CD106<sup>-</sup>). \*\*\* $p$ -valor < 0.001.

### 3.2.2. Microscopía confocal

Los análisis de inmunofluorescencia para Kalirina y CHD7 junto con los marcadores de activación endotelial (CD62E y CD106) mostraron unos resultados similares a los observados mediante citometría de flujo confirmándose la expresión de las dos proteínas en CEs (Figura 38) así como también la presencia de VEs desde las CEs activadas con TNF-  $\alpha$  (Figura 39)



**Figura 38. Expresión de Kalirina y CHD7 en células activadas con TNF- $\alpha$ .** Los análisis por inmunofluorescencia confirman el incremento de las proteínas Kalirina (A) y CHD7 (B) en células tratadas con TNF-  $\alpha$  que expresaban los marcadores de activación endotelial E-Selectina y VCAM-1. CD62E: E-Selectina; CD106: VCAM-1.



**Figura 39. Expresión de Kalirina y CHD7 en VEs del plasma de CEs activadas con TNF- $\alpha$ .** Las flechas indican las VEs en las CEs.

Los resultados de este trabajo han sido publicados recientemente en la revista *Oncotarget*.

# Discusión



La hipertensión arterial es una patología de etiología multifactorial que presenta una alta prevalencia a nivel mundial. Uno de los principales órganos afectados a consecuencia del incremento en la PA es el riñón, lo que conlleva al desarrollo de la albuminuria. Los niveles altos de albúmina excretada en orina son marcadores de disfunción vascular generalizada y predictor de futuras complicaciones cardiovasculares y/o renales. Los fármacos inhibidores del SRA parecen ser la mejor elección para el tratamiento de estos pacientes y, por tanto, revertir el proceso de daño renal. Sin embargo, hay un número no despreciable de pacientes que a pesar de estar tratados crónicamente con supresores del SRA, presentan una alta prevalencia de albuminuria e incluso aparece albuminuria *de novo* progresando a enfermedad cardiorrenal.

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un amplio estudio del desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos tratados crónicamente con supresores del SRA mediante varias estrategias multi-proteómicas tanto en plasma como en VEs derivadas del plasma. Los resultados obtenidos en plasma han permitido identificar perfiles moleculares relacionados con la aparición de la albuminuria, así como también perfiles moleculares asociados al daño renal crónico. Además, el análisis prospectivo en individuos normoalbuminúricos permitió identificar proteínas con un potencial valor pronóstico del desarrollo de albuminuria sugiriendo que estas proteínas podrían ser detectadas más tempranamente que el propio valor de albuminuria evitándose la progresión del daño renal. Por otro lado, el análisis proteómico en las VEs circulantes del plasma ha permitido identificar tres proteínas diferencialmente expresadas en individuos con albuminuria, dos de ellas implicadas en la disfunción endotelial de los vasos sanguíneos, lo que hace que tengan un potencial uso clínico en la evaluación del daño endotelial y monitorización del daño renal.

Por ello, la búsqueda de potenciales dianas pronósticas mediante un abordaje multi-proteómico que permitan la detección precoz de pacientes normoalbuminúricos con mayor riesgo a desarrollar albuminuria permitirá adoptar una nueva estrategia farmacológica a nivel preventivo con una potencial mejora y regresión del daño cardiorrenal. Además, los análisis bioinformáticos han permitido profundizar en el conocimiento de los procesos biológicos que se encuentran alterados en estos individuos para entender los mecanismos moleculares que están directamente implicados en la aparición de la albuminuria y en la progresión del daño renal. Basándonos en estos procesos alterados relacionados con una mayor activación del sistema inmune en los

individuos con daño orgánico crónico, se plantea una futura estrategia terapéutica basada en una “supresión” del sistema inmune en estos pacientes para tratar la hipertensión y revertir, por tanto, el proceso de daño cardiorrenal ya que, hasta la fecha, el tratamiento para la HTA ha consistido en la supresión del SRA y disminución de la PA.

## **1. ABORDAJE MULTI-PROTEÓMICO EN PLASMA DE PACIENTES HIPERTENSOS CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA**

Con el objetivo de identificar paneles moleculares asociados al desarrollo de la albuminuria y progresión del daño renal, se han llevado a cabo dos análisis proteómicos complementarios mediante 2D-DIGE e iTRAQ en una cohorte de individuos hipertensos no diabéticos tratados crónicamente con supresores del SRA. Posteriormente, se realizaron diferentes ensayos ortogonales (SRM y turbidimetría) que permitieron la confirmación de algunas de estas alteraciones proteicas en una cohorte independiente de pacientes con mayor número de individuos tanto diabéticos como no diabéticos.

Los resultados del análisis diferencial mediante 2D-DIGE llevado a cabo en plasma deplecionado han permitido identificar un total de 12 proteínas con niveles de expresión alterados entre los distintos grupos de estudio. Estas proteínas son el complemento factor B (CFAB), hemopexina (HEMO), proteína de unión a vitamina D (VTDB), kininógeno-1, alfa-2 glicoproteína rica en leucina (A2GL), globulina de unión a hormonas sexuales, proteína 2 relacionada con el complemento factor H, factor XIII de coagulación cadena B (F13B), paraoxonasa 1 (PON1), componente P del amiloide sérico (SAMP), inter alfa tripsina inhibidor cadena pesada H4 y fetuina A. Tras el análisis de agrupamiento de los individuos con las proteínas diferenciales mediante ACP se pudo observar la perfecta separación de los tres grupos de estudio, lo que sugiere que en estos individuos existen unos perfiles proteicos característicos. De manera paralela y utilizando la misma cohorte de individuos que en el ensayo anterior, se realizó un análisis proteómico diferencial mediante iTRAQ. Los resultados obtenidos permitieron realizar un análisis muy robusto y profundo del proteoma del plasma de estos sujetos objeto de estudio identificando hasta un total de 4935 proteínas diferentes. Tras los análisis comparativos, se encontraron 36 proteínas con diferencias estadísticamente

significativas entre los diferentes grupos estudiados. Como podemos observar ambas técnicas son complementarias ya que en cada una de ellas se han encontrado proteínas únicas diferenciales. Una vez integrado todos los resultados, se confirmaron 17 proteínas mediante la técnica SRM en una cohorte diferente de 105 pacientes en plasma sin deplecionar. Estas proteínas son CFAB, inmunoglobulina cadena ligera kappa (IGKC), inmunoglobulina cadena alfa-2 región C (IGHA2), inmunoglobulina gamma-2 región C (IGHG2), inmunoglobulina lambda cadena V-III región LOI (LV302), inmunoglobulina gamma-3 región C (IGHG3), A2GL, PON1, proteína 9 que contiene dominios NACHT, LRR y PYD (NALP9), SAMP, HEMO, ubiquitina hidrolasa carboxil-terminal 47 (UBP47), proteína homóloga DnaJ subfamilia C miembro 9 (DNJC9), VTDB, F13B, transportador 1 de la ornitina mitochondrial (ORNT1) y condroadherina (CHADL).

La gran mayoría de estas proteínas están implicadas en la respuesta del sistema immune, inflamación y estrés del reticulo endoplasmático, lo que apunta a la activación de estos procesos en pacientes con albuminuria. Además, las curvas ROC, de gran utilidad para evaluar los test diagnósticos, mostraron una buena especificidad y sensibilidad de estas proteínas marcadoras, lo que podrían tener un potencial valor para identificar y clasificar a los pacientes hipertensos al inicio de la albuminuria. Las alteraciones proteómicas encontradas han permitido caracterizar a nivel molecular aquellos procesos biológicos relacionados con el desarrollo de la albuminuria y con el daño orgánico crónico y, por lo tanto, asociados a la progresión cardiorrenal.

### **Perfil proteómico asociado al desarrollo de albuminuria**

Un panel de 4 proteínas (CFAB, IGKC, IGHA2 y HEMO) mostraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de individuos que desarrollaron albuminuria *de novo* comparado con individuos normoalbuminúricos. Por lo tanto, estas proteínas podrían tener un potencial valor predictivo para el desarrollo de albuminuria que es, además, lo que se observa al realizar la curva ROC comparando individuos dnA frente a N. La proteína CFAB, componente de la respuesta immune innata, es la única proteína que aparece exclusivamente en el grupo de albuminuria *de novo* cuyos niveles basales parecen recuperarse en los pacientes con albuminuria mantenida en el tiempo. En un trabajo previo desarrollado por Schmaderer y col demostraron que la inmunidad innata es activada en estadios tempranos de la hipertensión y daño orgánico crónico<sup>147</sup> así como tambien en diferentes tipos de enfermedades renales<sup>148,149</sup>. De manera análoga, se

podría explicar el incremento de la proteína CFAB en plasma de pacientes con albuminuria *de novo* dada su participación en los procesos relacionados con la respuesta inmune.

### **Perfil proteómico asociado al daño orgánico crónico**

Por otra parte, hemos encontrado un panel proteómico compuesto por 16 proteínas potenciales marcadoras de daño renal crónico dado que sus niveles se encuentran alterados en individuos con albuminuria mantenida en el tiempo. Cabe destacar que 3 de estas 16 proteínas se encontraron alteradas en pacientes con albuminuria *de novo* (IGKC, IGHA2 y HEMO). Los resultados muestran el incremento en los niveles plasmáticos de 2 inmunoglobulinas en un estadio temprano de la patogénesis que permanecen alterados en fases más avanzadas del daño renal indicando, por tanto, que la sobreexpresión de estas proteínas persiste después del desarrollo de la albuminuria alta. En total, hemos encontrado niveles aumentados en 5 inmunoglobulinas en los individuos con albuminuria mantenida, lo que podría estar reflejando una condición inflamatoria a nivel intraglomerular contribuyendo al incremento de la permeabilidad glomerular que dará lugar al escape de albúmina en la orina en estos individuos. De manera similar, se produce un incremento en la permeabilidad a nivel de la vasculatura sistémica asociado a un estado inflamatorio generalizado<sup>150</sup>. Además, se observa una mayor activación de la respuesta inmune implicando a las proteínas LV302, IGHG2 e IGHG3 asociadas a la albuminuria persistente. De hecho, estudios previos realizados en un modelo animal de ERC, muy en línea con nuestros resultados, los autores asocian directamente la activación de células del sistema immune con una función renal dañada<sup>151</sup>. Además, las cadenas ligeras de inmunoglobulinas como IGKC y LV302 han sido asociadas con el fallo renal debido a que su acumulación en plasma se asocia a una disminución del eGFR y por tanto a una ineficiente eliminación de estas moléculas por los riñones<sup>152</sup>. En concordancia con otros estudios se sabe que el sistema immune juega un papel importante en la modulación del daño renal mediante la activación de citoquinas y mediadores de la inflamación<sup>153</sup>. Por lo tanto, estos estudios apoyan nuestros resultados obtenidos que apuntan a una mayor activación de la respuesta inmune en individuos con daño renal.

También hemos encontrado otro conjunto de 5 proteínas relacionadas con los procesos inflamatorios (A2GL, SAMP, NALP9, HEMO, y PON1) que se han asociado al daño orgánico persistente. Estos resultados sugieren que, a medida que progresa el daño

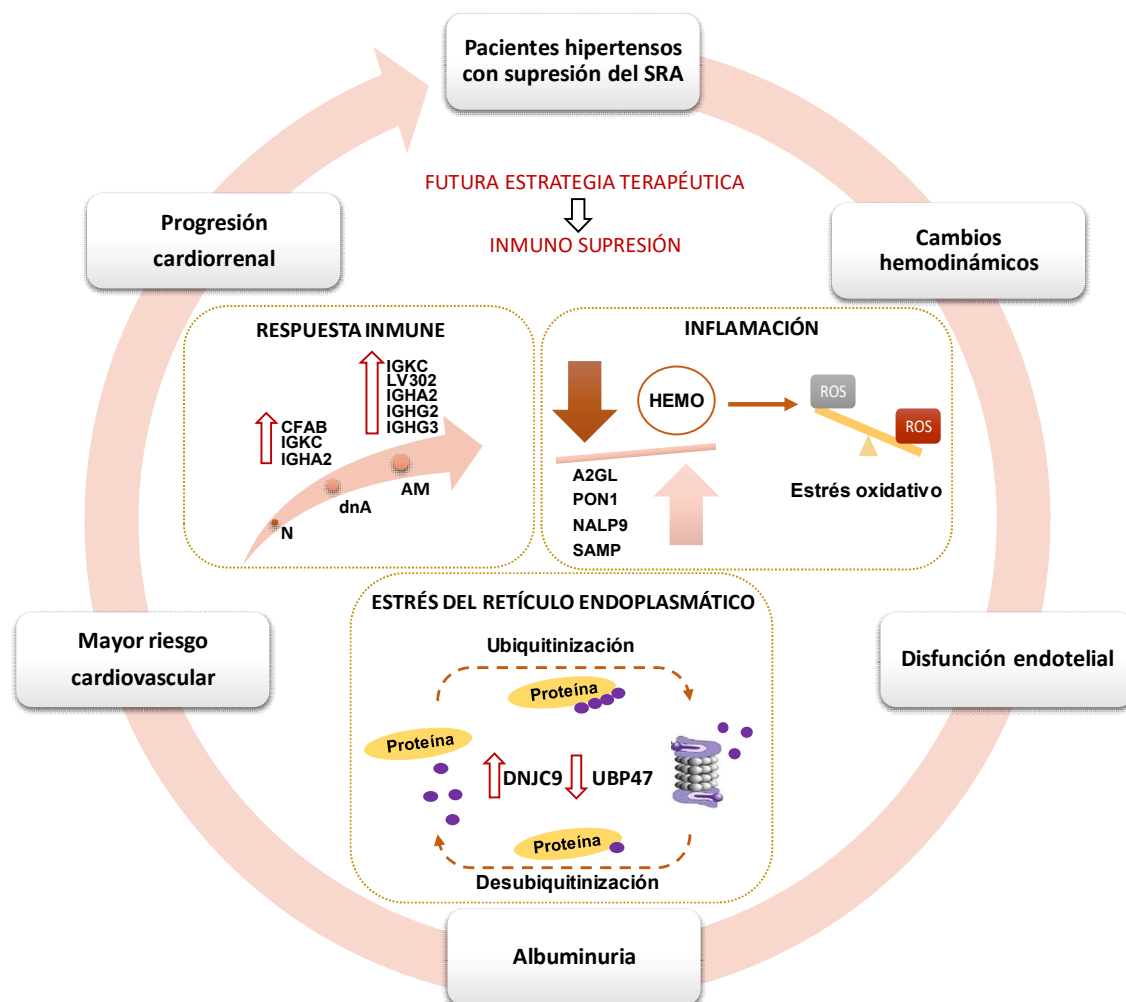


renal, se produce un un estado inflamatorio incrementado reflejado por los niveles alterados de estas proteínas y que contribuyen, por lo tanto, a la progresión de la aterosclerosis sistémica<sup>154,155,156,157</sup>. Además, la proteína HEMO también desempeña un papel antioxidante<sup>158,159</sup>, por lo que su disminución en individuos con albuminuria podría relacionarse con la disfunción endotelial presente en estos individuos e incrementando el riesgo cardiovascular y daño renal. De hecho, en otro trabajo publicado por integrantes de nuestro grupo de investigación y realizado con el mismo grupo de individuos, se ha demostrado que los pacientes con albuminuria presentaban un incremento del daño oxidativo, lo que apoya nuestros resultados<sup>160</sup>.

Por otro lado, describimos un grupo formado por 2 proteínas, UBP47 y DNJC9, caracterizadas por su implicación en la activación del proteasoma en situaciones de estrés del retículo endoplásmico (ERS). En la progresión de la ERC, la sobrecarga de albúmina conlleva a un mayor ERS en el riñón, lo cual se ha asociado con la apoptosis de las células tubulares proximales<sup>161</sup>. Una reabsorción defectuosa de la albúmina en los túbulos proximales podría ser producida y explicada a través de este daño tubular proximal<sup>162</sup>. Los niveles alterados de UBP47 y DNJC9 en pacientes con albuminuria mantenida apuntan a una activación de los mecanismos de defensa para contrarestar el ERS, responsable de la degradación de proteínas mediante el proteasoma. Por un lado, la proteína DNJC9 que aparece aumentada en estos individuos está implicada en el marcaje de ubiquitinas de proteínas mal plegadas conduciendo a su degradación por el proteasoma. Por otro lado, la proteína UBP47 cuya función es desubiquitinar las proteínas, se encuentra disminuida en estos pacientes lo que conlleva al proceso opuesto realizado por la proteína DNJC9. Los niveles alterados de ambas proteínas en individuos con albuminuria mantenida podrían dar lugar la degradación de proteínas defectuosas. La activación del sistema ubiquitina-proteasoma puede no ser capaz de compensar el ERS, lo cual ha sido demostrado que conlleva al daño glomerular desencadenado por la activación de las vías apoptóticas en el riñón bajo condiciones de estrés<sup>163</sup>. Las curvas ROC para estas proteínas han mostrado una clasificación perfecta de los individuos AM y, considerando que estas proteínas nunca antes se habían detectado en plasma, pueden tener un potencial valor para la monitorización de la función renal.

En resumen, podemos decir que los pacientes hipertensos que desarrollan albuminuria *de novo* bajo condiciones de supresión del SRA muestran una activación temprana de la respuesta inmune y con la evolución hacia albuminuria mantenida, se observa una

mayor activación de esta respuesta (Figura 40). En este sentido, nuestros resultados están en concordancia con estudios previos apuntando a un papel importante de la respuesta inmune en la patogénesis de la hipertensión<sup>164</sup>. Además, el estudio de estas proteínas nos ha permitido dilucidar las vías moleculares específicas que se encuentran implicadas en la patogénesis del daño renal. Este hecho nos lleva a plantearnos la hipótesis de que una buena estrategia para estos individuos sería una terapia anti-inmune para tratar la hipertensión<sup>165</sup>. De hecho, un estudio previo en ratas hipertensas sometidas a este tipo de terapias mostró un incremento en el eGFR, una disminución de la excreción de proteínas en orina<sup>166</sup> y una reducción en la presión arterial, inflamación y especies reactivas de oxígeno<sup>167</sup>, lo que apoya este potencial tratamiento para prevenir el desarrollo de la albuminuria y por tanto la progresión del daño cardiorenal.



**Figura 40. Representación esquemática de los procesos biológicos alterados en pacientes hipertensos con albuminuria tratados crónicamente con supresores del SRA.** Entre los mecanismos implicados en la patogénesis del daño renal caben destacar la activación del sistema inmune, inflamación y estrés del retículo endoplasmático. Además, se plantea la posibilidad de una futura estrategia preventiva mediante la supresión del sistema inmune con el fin de revertir la progresión del daño renal. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida; ROS: especies reactivas de oxígeno.

### **Proteínas predictoras del desarrollo de albuminuria y marcadoras de daño renal**

Por otro lado, seleccionamos un conjunto de tres proteínas diferencialmente expresadas tras el análisis iTRAQ para ser analizadas mediante turbidimetría en una cohorte independiente de pacientes. Esta metodología tiene la ventaja de ser ampliamente accesible para la práctica clínica en muestras de plasma o suero, ya que estos equipos de análisis se encuentran en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos. La albuminuria se ha considerado el clásico biomarcador para evaluar la detección temprana de un mayor riesgo cardiovascular y potencialmente de ERC en la práctica clínica<sup>168</sup>. Su capacidad predictiva se basa en el hecho de que el daño microvascular está presente en el riñón y, junto con otras manifestaciones de daño orgánico diana, han mostrado predecir la mortalidad incluso cuando el riesgo CV global calculado mediante el estimador SCORE no es elevado<sup>169</sup>. El descubrimiento de proteínas con valor pronóstico en estadios tempranos de la enfermedad con una fácil implementación en el ámbito clínico permitirá estratificar pacientes con un mayor riesgo de desarrollar albuminuria alta y, por tanto, mayor riesgo de daño cardiorrenal. La identificación de estos individuos en etapas más tempranas supondría una excelente estrategia para realizar una intervención terapéutica más temprana donde aún no se hayan manifestado signos de daño renal.

Las proteínas de fase aguda analizadas fueron ceruloplasmina (CP), alfa-1 glicoproteína ácida (ORM1) y haptoglobina (HPT). Todas ellas son producidas por el hígado y se han visto directamente implicadas en los procesos inflamatorios asociados al riesgo cardiovascular.

HPT es una glicoproteína del plasma cuyos niveles aparecen incrementados durante los procesos relacionados con la inflamación<sup>170</sup>. Esta proteína se une a la hemoglobina libre para prevenir la pérdida de hierro a través de los riñones, así como también evitar el daño oxidativo en la nefrona<sup>171,172</sup>. Además, un estudio previo sugirió que la HPT estaba directamente implicada en el daño de los podocitos dependiente del sistema del complemento mediante el complejo C5b-9 cuya activación implica la liberación de proteasas, oxidantes y factores de crecimiento produciendo un daño de la integridad funcional de la membrana basal glomerular<sup>173</sup>. La acumulación de las especies reactivas de oxígeno producidas por los neutrófilos y macrófagos<sup>174</sup> pueden causar la peroxidación lipídica local produciendo alteraciones en la permeabilidad glomerular, lo que conlleva al desarrollo del escape de proteínas en el espacio de Bowman<sup>175</sup>. Los niveles aumentados de HPT en orina están correlacionados con la pérdida del filtrado

glomerular anterior al desarrollo de albuminuria muy alta debido a que el incremento de la permeabilidad glomerular permite que la haptoglobina del suero se escape al espacio urinario<sup>176</sup>. Nosotros hemos encontrado niveles aumentados de HPT en plasma de pacientes con albuminuria muy alta que podrían deberse a que los niveles no son contrarrestados con el incremento de la excreción urinaria. Además, hemos encontrado un incremento gradual de HPT en relación con la albúmina en pacientes normoalbuminúricos teniendo en cuenta los niveles de albuminuria normal-alta (10-20 mg ACR en hombres y 20-30 mg ACR en mujeres) siendo más significativo en individuos no diabéticos. Estos resultados podrían indicar que esta proteína se encuentra aumentada desde estadios tempranos de albuminuria alta para contrarrestar el estrés oxidativo originado por el desarrollo del daño renal, independientemente de la presencia o ausencia de diabetes tipo 2.

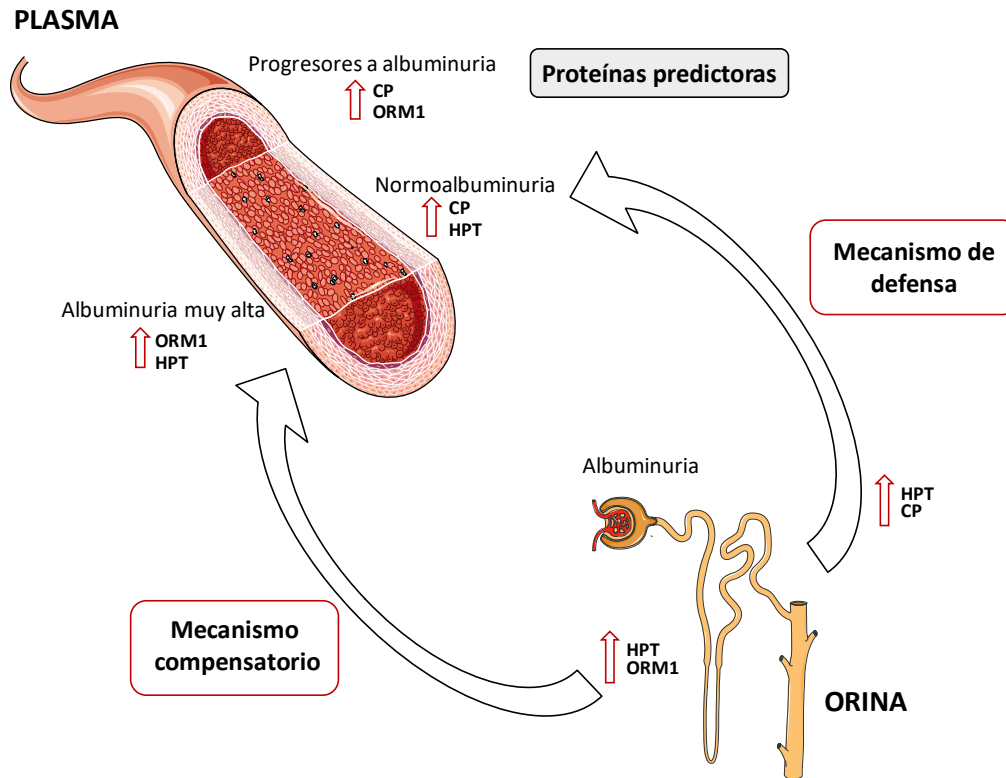
CP es una proteína antioxidante que juega un papel importante en el transporte de cobre y también, participa en la coagulación, angiogénesis y homeostasis del hierro<sup>177</sup>. Sus niveles en plasma aumentan por agonistas inflamatorios durante una reacción de fase aguda<sup>178</sup> y, además, se ha asociado a un incremento del riesgo cardiovascular<sup>179</sup> y de los niveles de albuminuria en hombres con diabetes tipo 2<sup>180</sup>. En nuestro estudio, CP mostró una correlación positiva con los niveles de albúmina en pacientes normoalbuminúricos, tanto en diabéticos como no diabéticos sugiriendo los niveles de esta proteína como posible predictor del desarrollo de albuminuria. Estos resultados se vieron reforzados a partir del estudio prospectivo realizado donde se observó el incremento de esta proteína en pacientes que progresaron hacia niveles mayores de albuminuria después de dos años de seguimiento. Los niveles aumentados de CP en plasma habían sido descritos previamente en pacientes diabéticos<sup>181</sup>, mientras que nuestros datos proporcionan nuevas evidencias de resultados similares en una población más amplia que incluyen individuos hipertensos no diabéticos, lo cual no ha sido descrito previamente en la literatura.

ORM1 es una de las principales proteínas de fase aguda cuyos niveles en plasma aumentan en respuesta a un daño tisular sistémico, inflamación o infección<sup>182</sup>. Esta proteína se ha considerado un marcador de la permeabilidad glomerular sugiriendo ser un indicador más sensible y temprano que la propia albúmina debido a que tiene un peso molecular menor y podría atravesar la membrana glomerular más fácilmente<sup>183</sup>.

En nuestro estudio, el grupo de pacientes con albuminuria muy alta presentaba niveles aumentados de ORM1 que podrían ser debidos a una sobreproducción de esta proteína

por el riñón para compensar la pérdida por la orina. De manera similar a la CP, ORM1 es, además, un predictor del desarrollo de albuminuria alta en pacientes con valores normales de albuminuria.

Como resumen podemos decir que los pacientes hipertensos que progresan a albuminuria presentan mayores niveles de proteínas de fase aguda en plasma, las cuales podrían estar implicadas directamente en el daño renal progresivo (Figura 41). ORM1 y HPT pueden ser consideradas marcadores de daño orgánico avanzado e irreversible de enfermedad renal. Por otro lado, las correlaciones positivas de CP y HPT con los niveles de albúmina en pacientes normoalbuminúricos podrían sugerir que estas proteínas reflejan un estado oxidativo e inflamatorio en el riñón durante el desarrollo de la albuminuria alta. La cuantificación absoluta de estos marcadores en plasma mediante ensayos de turbidimetría proporcionaría una fácil aplicación con una finalidad clínica para predecir estadios tempranos del desarrollo de albuminuria, como en el caso de CP y ORM1, así como también para monitorizar el daño orgánico crónico presente en pacientes con albuminuria muy alta en el caso de HPT y CP. Además, el aumento de CP y ORM1, que predicen el desarrollo de albuminuria, es detectado más tempranamente en plasma que en orina, dado que un estudio reciente llevado a cabo por Gonzalez-Calero y col. se encontraron niveles aumentados de CP en orina en individuos con albuminuria *de novo*<sup>184</sup>. Estos resultados nos sugieren que el análisis rutinario de estas proteínas mediante análisis turbidimétricos podría ser de gran utilidad para evaluar la función renal en pacientes hipertensos sin signos de disfunción renal.



**Figura 41. Representación esquemática de las posibles implicaciones funcionales de las proteínas diferenciales.** Los niveles aumentados en plasma de HPT y ORM1 en pacientes con albuminuria muy alta podrían ser debido a un mecanismo compensatorio para contrarrestar la pérdida de estas proteínas por la orina. El incremento progresivo de CP y HPT en pacientes con normoalbuminuria podría producirse como un mecanismo de defensa contra el daño oxidativo y la inflamación que tiene lugar en el glomérulo renal. Además, el estudio prospectivo en la evolución de pacientes normoalbuminúricos sugiere el potencial valor predictivo de las proteínas ORM1 y CP en el desarrollo de la albuminuria alta. HPT: haptoglobina; CP: ceruloplasmina; ORM1: alfa-1 glicoproteína ácida.

## 2. ABORDAJES PROTEÓMICOS EN LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DEL PLASMA DE PACIENTES HIPERTENSOS CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SRA

Como hemos ido viendo a lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral, el desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos con supresión crónica del SRA es un indicador de la ineficaz respuesta terapéutica, lo que supone un mayor riesgo cardiovascular<sup>185</sup>. A consecuencia del incremento de la PA, estos pacientes sufren un estrés de cizallamiento en diferentes zonas del sistema circulatorio<sup>186</sup> lo que conlleva a una mayor activación en el endotelio y la consecuente disfunción endotelial<sup>187</sup>. Estudios previos demostraron, además, que estos pacientes presentan un mayor estrés oxidativo<sup>188</sup>. Las especies reactivas de oxígeno disminuyen la biodisponibilidad del óxido nítrico endotelial ya sea bien, por una disminución de su producción y/o por una mayor inactivación<sup>189</sup> contribuyendo también a una mayor disfunción endotelial. Se ha demostrado que la

disfunción endotelial producida en los riñones de pacientes hipertensos origina también un empeoramiento en el daño renal<sup>190</sup>. Dado que las alteraciones en el filtrado de albúmina dan lugar a la aparición de albuminuria alta, la búsqueda de nuevos indicadores que nos permitan identificar los procesos implicados en la progresión de la albuminuria sería de gran utilidad para caracterizar mejor el estado de los pacientes hipertensos y adoptar una estrategia terapéutica preventiva más eficaz, que es el objetivo principal de este trabajo. En este sentido, el análisis de las VEs parece ser una aproximación de gran utilidad debido a que el estrés por cizallamiento incrementa la liberación de EMVs<sup>191</sup> conllevando a una mayor liberación de VEs en el torrente circulatorio de pacientes con albuminuria<sup>192</sup>. Además, las proteínas transportadas por estas EMVs pueden proporcionar una información valiosa sobre los mecanismos moleculares que tienen lugar en las CEs y su utilidad como indicadores del riesgo cardiovascular.

Por ello, en este estudio hemos realizado un análisis diferencial mediante iTRAQ de las VEs circulantes en una pequeña cohorte de individuos hipertensos no diabéticos tratados crónicamente con supresores del SRA. Seguidamente, se confirmaron algunas proteínas en una cohorte independiente con mayor número de individuos tanto diabéticos como no diabéticos y para finalizar, se llevó a cabo un estudio *in vitro* con el objetivo de estudiar el posible papel de dos proteínas diferenciales en la disfunción endotelial.

Tras la realización del análisis iTRAQ se ha conseguido cuantificar la abundancia de 2467 proteínas en VEs circulantes en plasma. De ellas, 19 proteínas se encontraron diferenciales en pacientes con albuminuria respecto a pacientes normoalbuminúricos. Un conjunto de 3 proteínas (Kalirina, CHD7 y ORML2) fueron confirmadas en una cohorte independiente de 99 pacientes (50 normoalbuminúricos y 49 pacientes con albuminuria) mediante los análisis por SRM. Los resultados mostraron que tanto Kalirina como CHD7 estaban aumentadas en pacientes que desarrollaron albuminuria *de novo* y por tanto podrían ser indicadores de la aparición de albuminuria. Además, se encontraron correlaciones positivas de la Kalirina y CHD7 con el marcador de activación endotelial CD62E (E-Selectina). Este resultado nos lleva a plantearnos la hipótesis de que estas 2 proteínas podrían ser liberadas por las CEs tras su activación mediante las VEs. Para corroborarlo, se analizaron los niveles de estas proteínas mediante un modelo *in vitro* de activación endotelial. Los resultados mostraron un

aumento significativo en los niveles de Kalirina y CHD7 en CEs que expresaban tanto E-Selectina como CD106 (VCAM-1). Esto demuestra el posible papel de estas proteínas en la activación endotelial celular dentro de los vasos sanguíneos explicando, por tanto, el aumento observado en las EVs de pacientes con albuminuria teniendo en cuenta la disfunción endotelial producida en estos individuos.

Kalirina es un factor de intercambio nucleotídico Rho guanina implicado en la transducción de señales. Su gen ha sido asociado a la susceptibilidad de enfermedad arterial coronaria<sup>193</sup> e infarto isquémico<sup>194</sup>. Aunque estudios previos señalan a una implicación directa de esta proteína en la aterosclerosis, en este trabajo mostramos por primera vez evidencias de su expresión en CEs humanas y el incremento observado en VEs circulantes en plasma de pacientes con albuminuria. Además, el aumento en la expresión de Kalirina en CEs activadas sugiere su implicación en los procesos relacionados con la disfunción endotelial. Se sabe que Kalirina inhibe la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)<sup>195</sup> y por ello, la hipótesis que relaciona esta proteína con la disponibilidad del óxido nítrico (NO) en el endotelio es factible y merece futuras investigaciones. También, se ha demostrado que la liberación del NO por las CEs disminuye la liberación de EMVs<sup>196</sup> por lo que la inhibición en la producción de NO desencadenada por la Kalirina está en concordancia con el aumento observado en CEs activadas, así como en el incremento de esta proteína en VEs en plasma de pacientes con albuminuria.

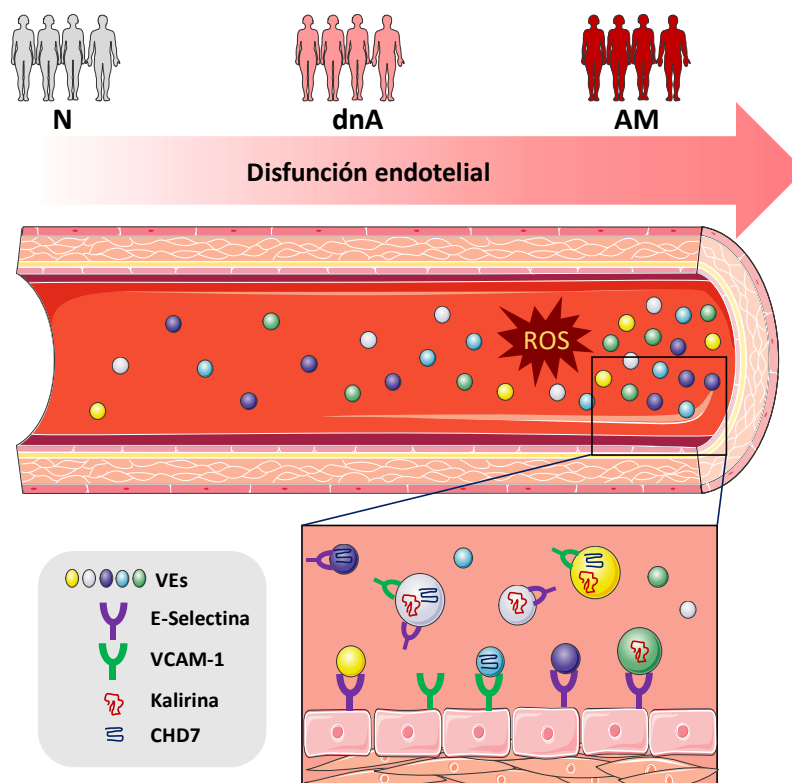
En cuanto a la proteína CHD7, se sabe que está directamente implicada con los procesos de la transcripción, es decir, la regulación de la cromatina a través del genoma<sup>197</sup>. Además, es crucial durante el proceso de la embriogénesis y ha sido implicada en el desarrollo del corazón y de los vasos sanguíneos<sup>198</sup>. CHD7 está implicada en el desarrollo del sistema cardiovascular cuyas mutaciones en el gen son responsables del syndrome CHARGE, en el cual se produce una afectación del corazón y sistema vascular<sup>199</sup>. Los resultados encontrados en el análisis diferencial muestran niveles aumentados de CHD7 en las VEs del plasma de pacientes con albuminuria *de novo*. Además, no se han reportado evidencias de la expresión de esta proteína en CEs hasta la fecha, lo cual ha sido demostrado por nosotros en este trabajo mediante técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia.

ORML2 es una proteína de membrana del retículo endoplásmico<sup>200</sup>, cuya implicación en el metabolismo de los esfingolípidos ha sido descubierto recientemente<sup>201</sup>. Esta



proteína nunca antes se había asociado al riesgo cardiovascular o al desarrollo o presencia de albuminuria. El incremento observado en VEs derivadas del plasma de pacientes con albuminuria podría suponer un importante papel de ORML2 en la patogénesis del daño renal.

A modo de resumen podemos decir que los resultados presentados y discutidos en este apartado apoyan la posible implicación de Kalirina y CHD7 en la disfunción endotelial producida por los vasos sanguíneos en pacientes con albuminuria cuyos niveles se encuentran aumentados en VEs circulantes (Figura 43). Teniendo en cuenta su implicación en la transducción de señales (Kalirina) y en la regulación de la transcripción (CHD7), podemos esperar que quizá tengan un papel fundamental en la función reguladora durante la activación de CEs. Por lo tanto, proponemos los niveles de las proteínas Kalirina y CHD7 en VEs circulantes como nuevos potenciales marcadores de disfunción endotelial. Mediante una pequeña biopsia líquida se podría monitorizar la condición vascular ofreciendo una valiosa información clínica para la estratificación del riesgo cardiovascular.

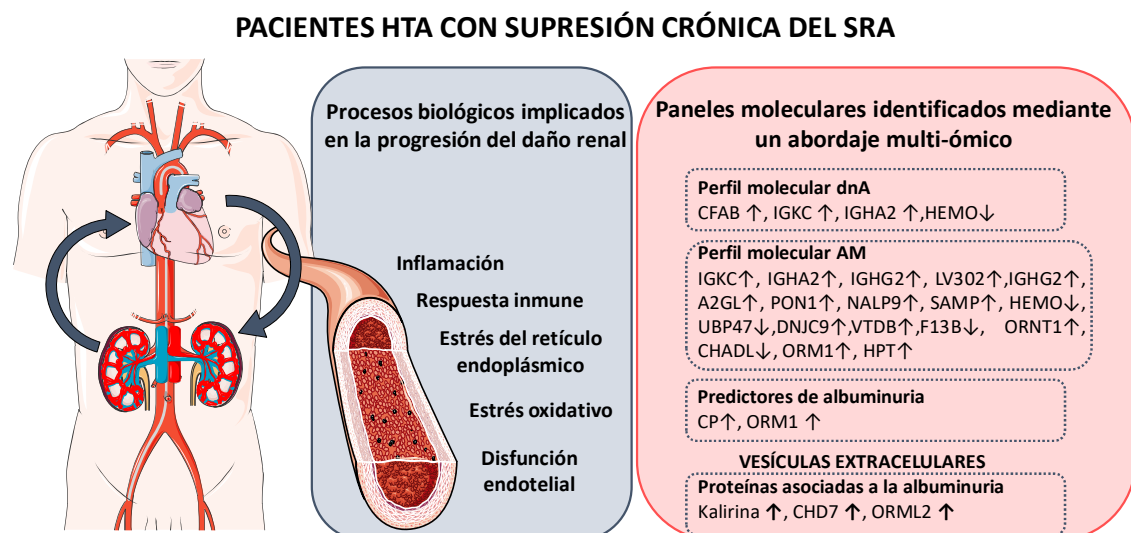


**Figura 43. Representación esquemática de la sobreexpresión de las proteínas Kalirina y CHD7 en CEs activadas.** Debido al aumento de la PA, el estrés de cizallamiento puede dar lugar al incremento de estas proteínas en las VEs circulantes en plasma de pacientes hipertensos con albuminuria. CEs: células endoteliales; VEs: vesículas extracelulares.

### 3. INTEGRACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

A lo largo de esta Tesis Doctoral, hemos identificado distintos perfiles moleculares en plasma y VEs circulantes de individuos hipertensos tratados crónicamente con supresores del SRA y con distintos grados de afectación renal (Figura 44).

Los resultados obtenidos tras los análisis diferenciales en plasma mostraron un panel predictor de desarrollo de albuminuria *de novo*, constituido por cuatro proteínas CFAB, IGKC, IGHA2 y HEMO implicadas principalmente en la activación de la respuesta inmune. Además, se identificó otro perfil molecular compuesto por 18 proteínas alteradas en pacientes con albuminuria mantenida en el tiempo y, por tanto, marcadoras de daño orgánico crónico (IGKC, IGHA2, IGHG2, L302, IGHG2, A2GL, PON1, NALP9, SAMP, HEMO, UBP47, DNJC9, VTDB, F13B, ORNT1, CHADL, ORM1, HPT) implicadas mayormente en la inflamación, respuesta inmune, apoptosis y estrés oxidativo. El estudio prospectivo realizado en individuos normoalbuminúricos mostró que las proteínas CP y ORM1 presentaban un potencial valor predictor en el desarrollo de albuminuria. Por otro lado, los análisis de las VEs circulantes del plasma han mostrado niveles alterados de tres proteínas Kalirina, CHD7 y ORML2 en individuos con albuminuria alta. Dos de ellas Kalirina y CHD7 se estudiaron en CE's aisladas de vena de adulto humano, lo que permitió demostrar el papel de ambas proteínas en la disfunción endotelial.



**Figura 44. Esquema general de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.** El análisis de las muestras de plasma y VEs circulantes del plasma mediante diferentes abordajes proteómicos en pacientes hipertensos tratados con supresores del SRA ha permitido identificar distintos paneles moleculares asociados a la albuminuria alta. HTA: Hipertensión arterial; SRA: Sistema renina-angiotensina; dnA: albuminuria *de novo*; AM: albuminuria mantenida.

Mediante la aplicación de un abordaje multi-proteómico en el estudio de la albuminuria en pacientes HTA con supresión crónica del SRA hemos conseguido aportar nuevos datos que contribuyen a ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la progresión del daño renal. Además, las evaluaciones de dichos paneles moleculares en estos individuos permitirán estratificar mejor a los pacientes y en base a ello, se podrá adoptar una estrategia terapéutica a nivel más temprano mejorando el pronóstico del paciente y evitando el desarrollo de futuras complicaciones cardiovasculares.



# Conclusiones



## Conclusiones

1. El empleo de dos aproximaciones proteómicas complementarias para estudiar el plasma deplecionado de pacientes hipertensos tratados con iSRA y distinto grado de afectación renal con la intención de buscar potenciales indicadores para el manejo adecuado de este tipo de individuos ha permitido identificar:
  - a) 12 proteínas diferencialmente expresadas entre los distintos grupos de estudio mediante el análisis proteómico diferencial 2D-DIGE.
  - b) Un total de 4935 proteínas mediante la técnica iTRAQ, de las cuales 36 estaban diferencialmente expresadas entre los distintos grupos de estudio, destacando la capacidad de esta técnica para realizar un análisis profundo de este tipo de muestra.
2. El uso combinado de la técnica SRM y turbidimetría permitió llevar a cabo la confirmación de 20 proteínas diferencialmente expresadas en plasma completo de pacientes hipertensos con distinto grado de afectación renal.
3. El análisis de proteómica diferencial mediante iTRAQ de VEs circulantes en plasma de individuos hipertensos tratados crónicamente con supresores del SRA y distinto grado de afectación renal ha permitido identificar un total de 20 proteínas diferencialmente expresadas entre los distintos grupos de estudio.
4. Mediante la técnica SRM se confirmaron 3 proteínas diferenciales en VEs en pacientes hipertensos crónicamente tratados con supresores del SRA y albuminuria.
5. Los análisis *in vitro* permitieron evaluar la expresión de las proteínas Kalirina y CHD7 en CEs activadas con TNF- $\alpha$ , proponiendo por tanto los niveles de ambas proteínas en VEs del plasma como marcadores de disfunción endotelial que permitiría la monitorización del daño vascular en estos individuos.
6. En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral mediante un abordaje multi-proteómico ha permitido identificar tres perfiles moleculares diferentes en plasma: 1) perfil proteómico asociado al desarrollo de albuminuria *de novo* formado por 4 proteínas relacionadas con la respuesta inmune y estrés oxidativo, 2) panel de 20 proteínas marcadoras de albuminuria mantenida en el tiempo relacionadas con la respuesta inmune, inflamación, estrés oxidativo y apoptosis y por último, 3) dos proteínas de fase aguda con valor predictor de individuos normoalbuminúricos que van a evolucionar a albuminuria en el futuro. En cuanto a las proteínas diferenciales en VEs del plasma hemos encontrado dos proteínas alteradas en individuos con albuminuria directamente implicadas en la disfunción endotelial de los vasos sanguíneos.





# Conclusions



1. The use of two complementary proteomic approaches to study depleted plasma from hypertensive patients iRAS and different degree of renal damage with the goal of searching potential indicators for the management of these individuals has allowed to identify:
  - a) 12 proteins differentially expressed between different groups of study through differential proteomic analysis 2D-DIGE.
  - b) A total of 4935 proteins using iTRAQ methodology, of which 36 proteins were differentially expressed between different groups of study highlighting the ability of this technique to perform in-depth analysis of this type of sample.
2. The combined use of SRM and turbidimetry allowed to carry out the confirmation of 20 differentially proteins in crude plasma of hypertensive patients with different degree of renal damage.
3. Differential proteomic analysis of circulating EVs in plasma from hypertensive patients with chronic suppression of RAS and different degrees of renal damage by iTRAQ has allowed identifying a total of 20 proteins differentially expressed between different groups of study.
4. Though SRM technique, three differentially proteins were confirmed in EVs from albuminuric patients chronically treated with RAS suppression.
5. In vitro analysis allowed evaluating the expression of Kalirin and CHD7 proteins in activated ECs. The levels of both proteins are proposed as markers of endothelial dysfunction to monitoring vascular damage in these individuals.
6. The results obtained in this Doctoral Thesis though multi-proteomic approach have allowed identifying three different molecular profiles in plasma: 1) proteomic profile associated with the development of albuminuria made up of 4 proteins related to immune response and oxidative stress, 2) panel of 20 proteins markers of maintained albuminuria related with immune response, inflammation, oxidative stress and apoptosis and, 3) 2 acute-phase proteins with predictive value of normoalbuminuric patients with risk of development albuminuria. Regarding differentially expressed proteins in EVs of plasma, we have identified 2 altered proteins related to endothelial dysfunction in albuminuric patients.



Anexos



## ANEXO 1

### PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

**Plasma molecular signatures in hypertensive patients with renin-angiotensin system suppression: new predictors of renal damage and de novo albuminuria indicators.**

**Baldan-Martin M**, Mourino-Alvarez L, Gonzalez-Calero L, Moreno-Luna R, Sastre-Oliva T, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Ruilope LM, de la Cuesta F, Barderas MG.

Hypertension. 2016;68:157-66.

**Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics.**

**Baldan-Martin M**, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Moreno-Luna R, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Segura J, Padial LR, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG.

Int J Cardiol. 2015;196:170-7.

**Kalirin and CHD7: novel endothelial dysfunction indicators in circulating extracellular vesicles from hypertensive patients with albuminuria.**

de la Cuesta F, **Baldan-Martin M**, Moreno-Luna R, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Lopez JA, Vazquez J, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG.

Oncotarget. Aceptado

**Proteomic analysis of blood extracellular vesicles in cardiovascular disease by LC-MS/MS analysis**

**Baldan-Martin M**, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Ruiz-Hurtado G, Ruilope LM, Barderas MG.

Methods in Molecular Biology. Enviado

**Cardiovascular risk study in patients with renin-angiotensin system blockade by means of the proteome of circulating extracellular vesicles.**

de la Cuesta F, **Baldan-Martin M**, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. Hipertens Riesgo Vasc. 2016;33:21-27.

## PARTICIPACIÓN EN PUBLICACIONES DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO

### **Exosomes in urine reveal altered protein targets in hypertensive patients under chronic suppression of renin-angiotensin system (RAS) who develop albuminuria.**

Gonzalez-Calero L, Martinez PJ, Martin-Lorenzo M, **Baldan-Martin M**, Ruiz-Hurtado G, de la Cuesta F, Calvo E, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. J Hypertens. En revisión.

### **Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression.**

Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, **Baldan-Martin M**, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Segura J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Cardiovasc Diabetol. 2016;15:8.

### **Hypertensive patients exhibit an altered metabolism. A specific metabolite signature in urine is able to predict albuminuria progression.**

Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Martínez PJ, **Baldan-Martin M**, Ruiz-Hurtado G, Segura J, de la Cuesta F, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Transl Res. 2016;178:25-37.

### **Patients with calcific aortic stenosis exhibit systemic molecular evidence of ischemia, enhanced coagulation, oxidative stress and impaired cholesterol transport.**

Mourino-Alvarez L, **Baldan-Martin M**, Gonzalez-Calero L, Martinez-Laborde C, Sastre-Oliva T, Moreno-Luna R, Lopez-Almodovar LF, Sanchez PL, Fernandez-Aviles F, Vivanco F, Padial LR, Akerstrom F, Alvarez-Llamas G, de la Cuesta F, Barderas MG. Int J Cardiol. 2016;225:99-106.

### **Contribution of proteomics to the management of vascular disorders.**

de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, **Baldan-Martin M**, Moreno-Luna R, Barderas MG. Translational Proteomics. 2014 Oct: 3-14. Review.



## **ANEXO 2: CURRICULUM VITAE**

### **1. EXPERIENCIA PROFESIONAL**

04/2013-04-2017: Contrato asociado a proyecto en el Laboratorio de Fisiopatología Vascular del Hospital Nacional de Paraplégicos. Laboratorio de la Dra. Maria Eugenia González Barderas.

### **2. FORMACIÓN ACADÉMICA**

Estudiante de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina en la Universidad Complutense de Madrid.

Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina en la Universidad Complutense de Madrid (Fecha de finalización: 07/2014).

Licenciatura en Biología (Especialidad Biología Sanitaria) en la Universidad Autónoma de Madrid (Fecha de finalización: 07/2013).

### **3. PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS**

- HPP: Iniciativa cardiovascular. Variaciones del perfil molecular y -ómico por la edad y la estratificación del riesgo cardiovascular. Financiado por la Fundación para la Investigación sanitaria. PI 14/01917. Duración: 2015-2017. IP: MG. Barderas.
- Abordaje integral de la hipertensión arterial resistente: mejora de diagnóstico y tratamiento y búsqueda de marcadores biológicos de respuesta terapéutica. Financiado por la Fundación para la Investigación sanitaria. PI 13/01581. Duración: 2014-2016. IP: F. de la Cuesta.
- Proteómica: nueva herramienta para la valoración de la respuesta de pacientes con lesión medular al tratamiento con hormona de crecimiento. Financiado por la Fundación Mapfre 2013. Duración: 2014. IP: MG. Barderas.
- Factores de riesgo, evolución y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y sus mecanismos. Financiado por las Redes Temáticas de Investigación Cooperativa. Enfermedades Cardiovasculares RD 12/0042/0071. Duración: 2013-2017. IP: Luis Rodríguez Padial.

- Nuevos abordajes proteómicos y metabolómicos en el estudio de la evolución de órganos diana en pacientes hipertensos tratados con bloqueantes del sistema renina angiotensina. Financiado por la Fundación para la Investigación sanitaria. PI 11/02239. Duración: 2011-2014. IP: MG. Barderas.

#### 4. PUBLICACIONES

1. Kalirin and CHD7: novel endothelial dysfunction indicators in circulating extracellular vesicles from hypertensive patients with albuminuria.  
de la Cuesta F, Baldan-Martin M, Moreno-Luna R, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Lopez JA, Vazquez J, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. *Oncotarget*. Aceptado
2. Patients with calcific aortic stenosis exhibit systemic molecular evidence of ischemia, enhanced coagulation, oxidative stress and impaired cholesterol transport.  
Mourino-Alvarez L, Baldan-Martin M, Gonzalez-Calero L, Martinez-Laborde C, Sastre-Oliva T, Moreno-Luna R, Lopez-Almodovar LF, Sanchez PL, Fernandez-Aviles F, Vivanco F, Padial LR, Akerstrom F, Alvarez-Llamas G, de la Cuesta F, Barderas MG. *Int J Cardiol*. 2016;225:99-106.
3. Exosomes in urine reveal altered protein targets in hypertensive patients under chronic suppression of renin-angiotensin system (RAS) who develop albuminuria.  
Gonzalez-Calero L, Martinez PJ, Martin-Lorenzo M, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, de la Cuesta F, Calvo E, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. *J Hypertension*. En Revisión.
4. Proteomic analysis of blood extracellular vesicles in cardiovascular disease by LC-MS/MS analysis  
Baldan-Martin M, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Ruiz-Hurtado G, Ruilope LM, Barderas MG. *Methods in Molecular Biology*. En Revisión.
5. Hypertensive patients exhibit an altered metabolism. A specific metabolite signature in urine is able to predict albuminuria progression.  
Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, Martínez PJ, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Segura J, de la Cuesta F, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. *Transl Res*. 2016;178:25-37.
6. Plasma molecular signatures in hypertensive patients with renin-angiotensin system suppression: new predictors of renal damage and de novo albuminuria indicators.  
Baldan-Martin M, Mourino-Alvarez L, Gonzalez-Calero L, Moreno-Luna R, Sastre-Oliva T, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Ruilope LM, de la Cuesta F, Barderas MG. *Hypertension*. 2016;68:157-66.

7. Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics.

Baldan-Martin M, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Moreno-Luna R, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Segura J, Padial LR, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. *Int J Cardiol.* 2015;196:170-7.

8. Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression.

Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Segura J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:8.

9. Cardiovascular risk study in patients with renin-angiotensin system blockade by means of the proteome of circulating extracellular vesicles.

de la Cuesta F, Baldan-Martin M, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. *Hipertens Riesgo Vasc.* 2016;33:21-27.

10. Contribution of proteomics to the management of vascular disorders.

de la Cuesta F, Mourino-Alvarez L, Baldan-Martin M, Moreno-Luna R, Barderas MG. *Translational Proteomics.* 2014 Oct: 3-14. Review.

## **5. ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN**

- Estancia en la Unidad de Investigación experimental y clínica de las patologías cardiovasculares de los Dres. Massimo Volpe y Speranza Rubattu, Parque Tecnológico Neuromed, Pozzilli (Isernia), Italia. Duración: 01/09/2016-20/12/2016.
- Estancia en el Laboratorio de Proteómica del Dr. Jesús Vázquez Cobos en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, España. Duración: 1/10/2015-20/08/2016

## **6. DIRECCIÓN DE MÁSTER**

- Análisis comparativo de células endoteliales formadoras de colonias aisladas de la vena safena y tejido adiposo blanco mediante abordaje proteómico. Marcos Rubio Alarcón. 2015. Universidad de Castilla-La Mancha. Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica.

## **7. BECAS OBTENIDAS**

- Beca de la Sociedad Española de Proteómica (SeProt) para la asistencia al curso “Herramientas bioinformáticas y moleculares en la investigación biomédica), Santander (España), Agosto 2015.

## **8. COMUNICACIONES ORALES**

- Existe un perfil proteómico y metabolómico en sangre de pacientes hipertensos con valor pronóstico de la eficiencia de la supresión del sistema renina-angiotensina. Montserrat Baldan-Martin, Fernando de la Cuesta, Laura Mourino-Alvarez, Gloria Alvarez Llamas, Laura Gonzalez-Calero, Julián Segura, Luis R. Padial, Fernando Vivanco, Luis M. Ruilope, Maria G. Barderas. 19ª Reunión Nacional de la SEH-LELHA, Madrid (España), Marzo 2014.

## **9. COMUNICACIONES A CONGRESOS**

1. Novel endothelial dysfunction indicators in circulating extracellular vesicles from hypertensive patients with albuminuria. Montserrat Baldan-Martin, Rafael Moreno-Luna, Laura Mourino-Alvarez, Tamara Sastre-Oliva, Juan Antonio Lopez, Laura Gonzalez-Calero, Jesús Vazquez, Luis Rodriguez Padial, Gloria Alvarez-Llamas, Gema Ruiz-Hurtado, Fernando Vivanco, Luis M. Ruilope, Fernando de la Cuesta, Maria G. Barderas. 6<sup>th</sup> Congress of the Spanish Proteomics Society, Cadiz (España), Noviembre 2016.
2. Cardiovascular risk stratification by plasma proteomic. Step one: young people characterization. Montserrat Baldan-Martin, Juan Antonio Lopez, Laura Mourino-Alvarez, Tamara Sastre-Oliva, Tatiana Martin-Rojas, Nerea Corbacho, Paula J Martinez, Rafael Moreno-Luna, Laura Mourino-Alvarez, Tamara Sastre-Oliva, Juan Antonio Lopez, Laura Gonzalez-Calero, Jesús Vazquez, Luis Rodriguez Padial, Gloria Alvarez-Llamas, Gema Ruiz-Hurtado, Fernando Vivanco, Luis M. Ruilope, Fernando de la Cuesta, Maria G. Barderas. 6<sup>th</sup> Congress of the Spanish Proteomics Society, Cadiz (España), Noviembre 2016.
3. Identification of protein signatures in urine linked to cardiovascular risk in young population. Paula J. Martínez, Montserrat Baldán-Martin, Marta Martín-Lorenzo, Juan A. López, Jesús Vazquez, Enrique Calvo, M. Cabrera, Gema Ruiz-Hurtado, Luis M. Ruilope, Fernando Vivanco, Maria G. Barderas, Gloria Alvarez-Llamas. 6<sup>th</sup> Congress of the Spanish Proteomics Society, Cadiz (España), Noviembre 2016.

4. Urine proteomics reveal immune system response to albuminuria development in chronically treated hypertensive patients. Marta Martin-Lorenzo, Laura González-Calero, Montserrat Baldán-Martín, Paula J. Martínez, Fernando de la Cuesta, Gema Ruiz-Hurtado, Juan A. López, Jesús Vazquez, Maria G. Barderas, Luis M. Ruilope, Fernando Vivanco, Gloria Alvarez-Llamas. 6<sup>th</sup> Congress of the Spanish Proteomics Society, Cadiz (España), Noviembre 2016.
5. Plasma proteomics in hypertension: prediction and follow-up of albuminuria during chronic renin-angiotensin system suppression. Montserrat Baldan-Martin, Laura Mourino-Alvarez, Laura Gonzalez-Calero, Rafael Moreno-Luna, Tamara Sastre-Oliva, Juan Antonio Lopez, Jesús Vazquez, Fernando Vivanco, Gloria Alvarez-Llamas, Luis M. Ruilope, Fernando de la Cuesta, María G. Barderas. Frontiers in Cardiovascular Biology, Florencia (Italia), Julio 2016.
6. Perfiles moleculares identificados en orina y exosomas responden al desarrollo de albuminuria de novo en pacientes hipertensos con supresión crónica de RAS. Laura Gonzalez-Calero, Marta Martin-Lorenzo, Paula J. Martínez, Montserrat Baldán-Martín, Gema Ruiz-Hurtado, Julian Segura, Maria G. Barderas, Luis M. Ruilope, Fernando Vivanco, Gloria Alvarez-Llamas. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología, Oviedo (España), Octubre 2016.
7. Plasma proteomic utility in the prediction and maintenance of albuminuria in hypertensive patients with RAS suppression. Montserrat Baldan-Martin; Laura Mourino-Alvarez; Laura Gonzalez-Calero; Rafael Moreno-Luna; Tamara Sastre-Oliva; Juan Antonio Lopez; Jesus Vazquez; Fernando Vivanco; Gloria Alvarez-Llamas; Luis Miguel Ruilope; Fernando de la Cuesta; Maria G.Barderas. 21<sup>a</sup> Reunion Nacional de la SEH-LELHA, Valencia (España), Marzo 2016.
8. Plasma proteomic utility in the prediction and follow-up of albuminuria progression and organ damage during chronic renin-angiotensin system suppression in hypertension. Montserrat Baldan-Martin; Laura Mourino-Alvarez; Laura Gonzalez-Calero; Rafael Moreno-Luna; Tamara Sastre-Oliva; Juan Antonio Lopez; Jesus Vazquez; Fernando Vivanco; Gloria Alvarez-Llamas; Luis Miguel Ruilope; Fernando de la Cuesta; Maria G. Barderas. IV JORNADAS BIENALES DE JOVENES INVESTIGADORES en PROTEOMICA, Bilbao, Pais Vasco (España), Junio 2015.
9. Exploring the relationship between calcific aortic stenosis and atherosclerosis: effect of underlying coronary artery disease on the aortic valve proteome. Laura Mourino-Alvarez; Montserrat Baldan-Martin; Tamara Sastre-Oliva; Rafael Moreno-Luna; Luis

Fernando Lopez Almodovar; Esther Rosello Lleti; Miguel Rivera; Pedro Luis Sanchez; Luis Rodriguez Padial; Fernando de la Cuesta; Maria G. Barderas. IV JORNADAS BIENALES DE JOVENES INVESTIGADORES en PROTEOMICA, Bilbao, Pais Vasco (España), Junio 2015.

10. Specific protein profiles in urine and exosomes respond to de novo-high albuminuria development and its evolution in hypertensive patients chronically RAAS suppressed. Laura Gonzalez-Calero; Marta Martin-Lorenzo; Montserrat Baldan-Martin; Fernando de la Cuesta; Julian Segura; Maria G. Barderas; Luis Miguel Ruilope; Fernando Vivanco; Gloria Alvarez- Llamas. IV JORNADAS BIENALES DE JOVENES INVESTIGADORES en PROTEOMICA, Bilbao, Pais Vasco (España), Junio 2015.

11. The proteome of circulating extracellular microvesicles as a novel source of biomarkers for evaluating the therapeutic response of albuminuric patients with renin-angiotensin blockage. Fernando de la Cuesta; Montserrat Baldan-Martin; Laura Mourino-Alvarez; Gloria Alvarez-Llamas; Laura Gonzalez-Calero; Rafael Moreno-Luna; Tamara Sastre-Oliva; Julian Segura; Juan Antonio Lopez; Jesus Vazquez; Fernando Vivanco; Luis Miguel Ruilope; Maria G.Barderas. IV JORNADAS BIENALES DE JOVENES INVESTIGADORES en PROTEOMICA, Bilbao, Pais Vasco (España), Junio 2015.

12. Effectiveness evaluation of new therpaies for spinal cord injury treatment by proteomics analysis. Tamara Sastre-Oliva; Laura Mourino-Alvarez; Felix Gil Dones; Sergio Alonso Orgaz; Fernando de la Cuesta; Montserrat Baldan-Martin; Esclarin A.; Juan Antonio Lopez; Antonio Oliviero; Rafael Moreno-Luna; Maria G. Barderas. IV JORNADAS BIENALES DE JOVENES INVESTIGADORES en PROTEOMICA, Bilbao, Pais Vasco (España), Junio 2015.

13. El proteoma de las microvesículas circulantes constituye una nueva fuente de biomarcadores para la evaluación de la respuesta terapéutica en pacientes microalbuminúricos con bloqueo del sistema renina-angiotensina. Fernando de la Cuesta, Montserrat Baldan-Martin, Laura Mourino-Alvarez, Gloria Alvarez-Llamas, Laura Gonzalez-Calero, Gema Ruiz-Hurtado, Julian Segura, Fernando Vivanco, Luis M. Ruilope, Maria G. Barderas. 20ª Reunión Nacional de la SEH-LEHLHA, Oviedo (España), Marzo 2015.

14. Perfiles proteicos específicos en orina y exosomas responden al desarrollo de albuminuria de novo y su evolución en pacientes hipertensos tratados con bloqueantes

del SRAA. Laura Gonzalez-Calero, Marta Martin-Lorenzo, Montserrat Baldan-Martin, Fernando de la Cuesta, Gema Ruiz-Hurtado, Julian Segura, Maria G. Barderas, Luis M. Ruilope, Fernando Vivanco, Gloria Alvarez-Llamas. 20ª Reunión Nacional de la SEH-LEHLHA, Oviedo (España), Marzo 2015.

15. A characteristic proteomic and metabolomic profile in blood plasma with utility in predicting evolution of patients with arterial hypertension to albuminuria. Montserrat Baldan-Martin, Rafael Moreno-Luna, Gloria Alvarez-Llamas, Laura Gonzalez-Calero, Juan A. Lopez, Jesus Vazquez, Fernando Vivanco, Luis M. Ruilope, Fernando de la Cuesta, Maria G. Barderas. HUPO 13th Human Proteome Organization World Congress, Madrid (España), Octubre 2014.

16. Identification of a urine molecular fingerprint which responds to albuminuria condition and progression in hypertensive patients chronically RAAS suppressed. Laura Gonzalez-Calero, Marta Martin-Lorenzo, Aroa S. Maroto, Maria Posada-Ayala, Montserrat Baldan-Martin, Fernando de la Cuesta, Maria G. Barderas, Luis M. Ruilope, Gloria Alvarez-Llamas, Fernando Vivanco. HUPO 13th Human Proteome Organization World Congress, Madrid (España), Octubre 2014.

17. Quantitative proteomic analysis of microparticles in hypertensive patients with elevated cardio-renal risk. Fernando de la Cuesta, Montserrat Baldan-Martin, Rafael Moreno-Luna, Gloria Alvarez-Llamas, Laura Gonzalez-Calero, Juan A. Lopez, Jesus Vazquez, Fernando Vivanco, Luis M. Ruilope, Maria G. Barderas. HUPO 13th Human Proteome Organization World Congress, Madrid (España), Octubre 2014.

18. Elucidating the relationship between calcific aortic stenosis and atherosclerosis: A comprehensive proteomic study in aortic valve tissue. Laura Mourino-Alvarez, Fernando de la Cuesta, Tamara Sastre-Oliva, Montserrat Baldan-Martin, Luis F. Lopez-Almodovar, Esther Rosello-Lleti, Miguel Rivera, Pedro Luis Sanchez, Luis R. Padial, Maria G. Barderas. HUPO 13th Human Proteome Organization World Congress, Madrid (España), Octubre 2014.

19. A characteristic proteomic and metabolomics profile with utility in predicting evolution of patients with arterial hypertension. Montserrat Baldan-Martin, Laura Mourino-Alvarez, Fernando de la Cuesta, Laura Gonzalez-Calero, Gloria Alvarez-Llamas, Julián Segura, Cesar Cerezo, Luis R. Padial, Fernando Vivanco, Luis M. Ruilope, Maria G. Barderas. American Society of Hypertension, Nueva York (USA), Mayo 2014.

20. Identification of a urine molecular fingerprint which responds to microalbuminuria condition and evolution in hypertensive patients chronically RAAS suppressed. Laura Gonzalez-Calero, Marta Martin-Lorenzo, Maria Posada-Ayala, Montserrat Baldan-Martin, Fernando de la Cuesta, Julián Segura, Cesar Cerezo, Maria G. Barderas, Luis M. Ruilope, Gloria Alvarez-Llamas, Fernando Vivanco. American Society of Hypertension, Nueva York (USA), Mayo 2014.
21. Identificación de una huella molecular en orina que responde a albuminuria y su evolución en pacientes hipertensos tratados con bloqueantes del sistema renina angiotensina. Laura Gonzalez-Calero, Marta Martin Lorenzo, Maria Posada Ayala, Montserrat Baldan-Martin, Fernando de la Cuesta, Julián Segura, Maria G. Barderas, Luis M. Ruilope, Gloria Alvarez-Llamas, Fernando Vivanco. 19ª Reunión Nacional de la SEH-LEHLHA, Madrid (España), Marzo 2014.
22. Proteomics and Metabolomics: new tools to study albuminuria in patients with arterial hypertension. Montserrat Baldan-Martin, Laura Mourino-Alvarez, Fernando de la Cuesta, Luis M. Ruilope, Luis R. Padial, Maria G. Barderas. HUPO 12th World Congress, Yokohama (Japón), Septiembre 2013.
23. Aortic stenosis in a rabbit model: proteomic analysis of valve tissue. Laura Mourino-Alvarez, Fernando de la Cuesta, Montserrat Baldan-Martin; Maria G. Barderas. HUPO 12th World Congress, Yokohama (Japón), Septiembre 2013.

## **10. OTROS CURSOS Y ACTIVIDADES FORMATIVAS**

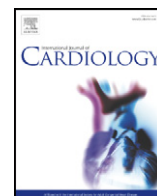
- IV Reunión científica de Proteómica Clínica, Centro de Investigación del Cancer, Salamanca (España), Diciembre 2015.
- Curso: Herramientas bioinformáticas y moleculares en la investigación biomédica), Santander (España), Agosto 2015.
- Curso: Capacitación como experimentador con animales de investigación (Categoría B), Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo (España), Mayo 2014.
- Curso: El proyecto proteoma humano: herramientas para su estudio y aplicaciones biomédicas, Universidad Complutense de Madrid, San Lorenzo de El Escorial (España), Julio 2013.
- Integración de Resultados Multi-ómicos: la clave en la investigación biomédica del siglo XXI, Madrid (España), Marzo 2013.



- Colaborador en la Semana Internacional del Cerebro (Brain Awareness Week 2011), patrocinada por la fundación DANA y Federación Europea de las Sociedades de Neurociencia (FENS). Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo (España), Marzo 2015.
- Colaborador en la Semana Internacional del Cerebro (Brain Awareness Week 2011), patrocinada por la fundación DANA y Federación Europea de las Sociedades de Neurociencia (FENS). Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo (España), Marzo 2015.
- Colaborador en el módulo “Formación en Centros de Trabajo” de 380 horas de duración, perteneciente al CFGC Laboratorio de Diagnóstico Clínico para alumnos del IES Juanelo Turriano. Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo (España), Abril-Junio 2013.

## **ANEXO 3**

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL



## Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin–angiotensin suppression by plasma proteomics



Montserrat Baldan-Martin<sup>a</sup>, Fernando de la Cuesta<sup>a</sup>, Gloria Alvarez-Llamas<sup>b</sup>, Laura Gonzalez-Calero<sup>b</sup>, Gema Ruiz-Hurtado<sup>c,d</sup>, Rafael Moreno-Luna<sup>a</sup>, Laura Mourino-Alvarez<sup>a</sup>, Tamara Sastre-Oliva<sup>a</sup>, Julian Segura<sup>c</sup>, Luis R. Padial<sup>e</sup>, Fernando Vivanco<sup>b,f</sup>, Luis M. Ruilope<sup>c,\*</sup>, Maria G. Barderas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Fisiopatología Vascular, Hospital Nacional de Parapléjicos (HNP), SESCAM, Toledo, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Inmunología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Unidad de Hipertensión, Instituto de Investigación i + 12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, Spain

<sup>e</sup> Departamento de Cardiología, Complejo Hospitalario de Toledo, SESCAM, Toledo, Spain

<sup>f</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 March 2015

Received in revised form 29 April 2015

Accepted 26 May 2015

Available online 29 May 2015

#### Keywords:

RAS suppression

Albuminuria

Organ damage

Plasma proteomics

Hypertension

### ABSTRACT

**Background:** High albuminuria is a strong predictor of development of cardiovascular events in hypertensive patients. The search for predictors identifying patients at risk of developing high albuminuria or presenting a more rapid progression in this parameter may represent an effective strategy for adequate intervention and better outcome.

**Methods and results:** Initially we investigated 24 patients presenting with normoalbuminuria, *de novo* albuminuria and sustained albuminuria. Plasma proteomics disclosed an upregulation of ceruloplasmin (CP), haptoglobin (HP) and alpha 1-acid glycoprotein (ORM1) that in a second step were selected for validation using turbidimetry assay in a cohort of 105 subjects. The validation showed that HP and ORM1 proteins were increased in patients presenting with very high albuminuria and potential irreversible kidney damage. CP and HP correlated positively with albuminuria values in normoalbuminuric patients. Finally, the levels of ORM1 and CP were increased in patients who progressed in their levels of albuminuria.

**Conclusions:** Our findings show that these proteins may potentially be useful for predicting the development of high albuminuria and to monitor renal damage.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

High albuminuria is a marker of generalized vascular dysfunction and is an important predictor of development of cardiovascular and renal events in both diabetic and non-diabetic hypertensive patients [1]. High albuminuria is defined as an elevated value of the albumin / creatinine ratio (ACR) in urine between 20–200 mg/24 h in men and

30–300 mg/24 h in the case of women [2]. In hypertensive patients, intraglomerular pressure and increased permeability of the glomerular barrier are the major determinants of the presence of high albuminuria [3]. A generalized increase in endothelial permeability due to hemodynamic and inflammatory processes [4] seems to be the initial triggering factor allowing the escape of albumin from the intra to the extravascular space.

Renin–Angiotensin System (RAS) suppression is needed in the control of albuminuria with the aim of reducing albumin levels through two simultaneously acting mechanisms, one consisting of normalization of systemic blood pressure [5] (BP) and the second of modifying intraglomerular hemodynamics and permeability [6].

Several urinary markers, such as IgG and N-acetylglucosaminidase (NAG), have been associated to the development of albuminuria in diabetic patients [7]. Moreover, α-2-HS-glycoprotein has been linked with inflammation and tubular damage and positively associated with increased follow-up albuminuria in diabetic patients too [8]. These proteins are frequently accompanied by lower values of estimated glomerular filtration rate (eGFR) and by a higher prevalence of albuminuria [9].

**Abbreviations:** CP, ceruloplasmin; HP, haptoglobin; ORM1, alpha 1-acid glycoprotein; RAS, renin–angiotensin system; ACR, albumin/creatinine ratio; BP, blood pressure; NAG, N-acetylglucosaminidase; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CKD, chronic kidney disease; N, normoalbuminuria; dnHA, *de novo* high albuminuria; SHA, sustained high albuminuria; HA, high albuminuria; VHA, very high albuminuria; iTRAQ, isobaric tags for relative and absolute quantification; LC–MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; ROC, receiver operating characteristic; CRP, C-reactive protein; ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB, angiotensin II receptor blockers; APOA1, apolipoprotein A1; APOE, apolipoprotein E; SLC40A1, solute carrier family 40 member 1; SLC11A2, solute carrier family 11; TF, transferrin; Hb, hemoglobin; GBM, glomerular basement membrane; GFR, glomerular filtration rate; AER, albumin excretion rate.

\* Corresponding author.

E-mail address: [ruilope@ad-hocbox.com](mailto:ruilope@ad-hocbox.com) (L.M. Ruilope).

## Plasma Molecular Signatures in Hypertensive Patients With Renin–Angiotensin System Suppression

### New Predictors of Renal Damage and De Novo Albuminuria Indicators

Montserrat Baldan-Martin, Laura Mourino-Alvarez, Laura Gonzalez-Calero, Rafael Moreno-Luna, Tamara Sastre-Oliva, Gema Ruiz-Hurtado, Julian Segura, Juan Antonio Lopez, Jesus Vazquez, Fernando Vivanco, Gloria Alvarez-Llamas, Luis M. Ruilope, Fernando de la Cuesta\*, Maria G. Barderas\*

**Abstract**—Albuminuria is a risk factor strongly associated with cardiovascular disease, the first cause of death in the general population. It is well established that renin–angiotensin system suppressors prevent the development of new-onset albuminuria in naïf hypertensive patients and diminish its excretion, but we cannot forget the percentage of hypertensive patients who develop de novo albuminuria. Here, we applied multiple proteomic strategy with the purpose to elucidate specific molecular pathways involved in the pathogenesis and provide predictors and chronic organ damage indicators. Briefly, 1143 patients were followed up for a minimum period of 3 years. One hundred and twenty-nine hypertensive patients chronically renin–angiotensin system suppressed were recruited, classified in 3 different groups depending on their albuminuria levels (normoalbuminuria, de novo albuminuria, and sustained albuminuria), and investigated by multiple proteomic strategies. Our strategy allowed us to perform one of the deepest plasma proteomic analysis to date, which has shown 2 proteomic signatures: (1) with predictive value of de novo albuminuria and (2) sustained albuminuria indicator proteins. These proteins are involved in inflammation, immune as well as in the proteasome activation occurring in situations of endoplasmic reticulum stress. Furthermore, these results open the possibility of a future strategy based on anti-immune therapy to treat hypertension which could help to prevent the development of albuminuria and, hence, the progression of kidney damage. (*Hypertension*. 2016;68:157-166. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07412.) • [Online Data Supplement](#)

**Key Words:** albuminuria ■ cause of death ■ hypertension ■ immune system ■ renin-angiotensin system

Albuminuria is a risk factor strongly associated with cardiovascular and renal complications particularly when diabetes mellitus and hypertension are present. However, in the absence of these 2 processes, albuminuria can be equally relevant as a predictor.<sup>1</sup> These facts reflect the enormous relevance of albuminuria to monitor cardiovascular disease, the first cause of death in the general population.<sup>2</sup> Different factors promote the development of albuminuria<sup>3</sup> and lead finally to an increased albumin leakage through the glomerular barrier.<sup>4-7</sup>

Renin–angiotensin system (RAS) suppression is considered the therapy of choice to prevent the development of new-onset albuminuria in naïf patients<sup>8,9</sup> and to diminish the amount of excreted albuminuria.<sup>10</sup> The positive effect depends on a reduction in blood pressure,<sup>11</sup> as well as a modification of intraglomerular hemodynamics and permeability.<sup>12</sup> Recent

studies conducted by our group have shown that despite an apparently adequate RAS suppression, a relevant percentage of hypertensive patients develop de novo albuminuria pointing to a progression of cardiovascular disease probably facilitated by an inappropriate therapeutic response to angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers.<sup>13</sup>

Moreover, we have also found an increased systemic oxidative damage in hypertensive patients who develop albuminuria under chronic RAS suppression suggesting that oxidative stress is one of the mechanisms underlying the development of albuminuria<sup>14</sup> in this situation.

These considerations highlight the need to continue searching for potential mechanisms and indicators of the development and progression of albuminuria in hypertensive patients under RAS suppression, considering that it will contribute

Received February 25, 2016; first decision March 23, 2016; revision accepted April 27, 2016.

From the Departamento de Fisiopatología Vascular, Hospital Nacional de Parapléjicos (HNP), SESCAM, Toledo, Spain (M.B.-M., L.M.-A., R.M.-L., T.S.-O., F.d.I.C., M.G.B.); Departamento de Inmunología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain (L.G.-C., F.V., G.A.-L.); Unidad de Hipertensión, Instituto de Investigación i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (G.R.-H., J.S., L.M.R.); Unidad de Proteómica CNIC, Madrid, Spain (J.A.L., J.V.); and Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense, Madrid, Spain (F.V.).

\*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07412/-DC1>.

Correspondence to Maria G. Barderas, Laboratorio de Fisiopatología Vascular, Edificio de Terapia 2ª planta, Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM, 45071 Toledo, España. E-mail [megonzalez@secam.jccm.es](mailto:megonzalez@secam.jccm.es) or Luis M. Ruilope, Unidad de Hipertensión, Instituto de Investigación i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain. E-mail [ruilope@ad-hocbox.com](mailto:ruilope@ad-hocbox.com)

© 2016 American Heart Association, Inc.

*Hypertension* is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07412

to better understand the pathogenesis of the progression of cardiovascular disease and renal disease under chronic treatment with either angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers.<sup>15,16</sup>

Recently, substantial improvements in the entire mass spectrometry-based proteomics pipeline, including sample preparation, liquid chromatography-mass spectrometry hardware, and data analysis, have been produced. In this study, we present the application of an omics strategy to approach the unbiased, nontargeted, study of albuminuria in hypertensive patients with RAS blockade searching for predictors and chronic organ damage markers in blood plasma (Figure 1A).

Our data show the existence of 2 characteristic plasma protein signatures described for the first time consisting of: (1) protein candidates to be markers of de novo albuminuria, composed by 4 proteins and (2) sustained albuminuria (SA) indicator proteins, made up of 16 proteins, which may be considered markers of end organ damage. The proteins hereby associated with albuminuria development point to the activation of the immune system, as well as inflammation and endoplasmic reticulum stress (ERS), which might be related to the underlying of simultaneous cardiorenal damage.

## Methods

### Patient Recruitment

Patient selection and classification was previously described in an initial article showing the development of albuminuria in patients during chronic RAS suppression.<sup>13</sup> Briefly, 1143 patients were followed up for a minimum period of 3 years with visits to the Hypertension Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, at least every 6 months. After that, the patients continued with their annual revisions. One hundred and twenty-nine hypertensive patients chronically RAS

suppressed with or without high albuminuria (48 diabetics and 81 nondiabetics, hypertensive RAS patients) were recruited between January 2011 and June 2013 in the unit (Figure 1B).

Albuminuria is defined as albumin/creatinine ratio in the urine >20 mg/24 hour and 30 mg/24 hour in men and women, respectively.

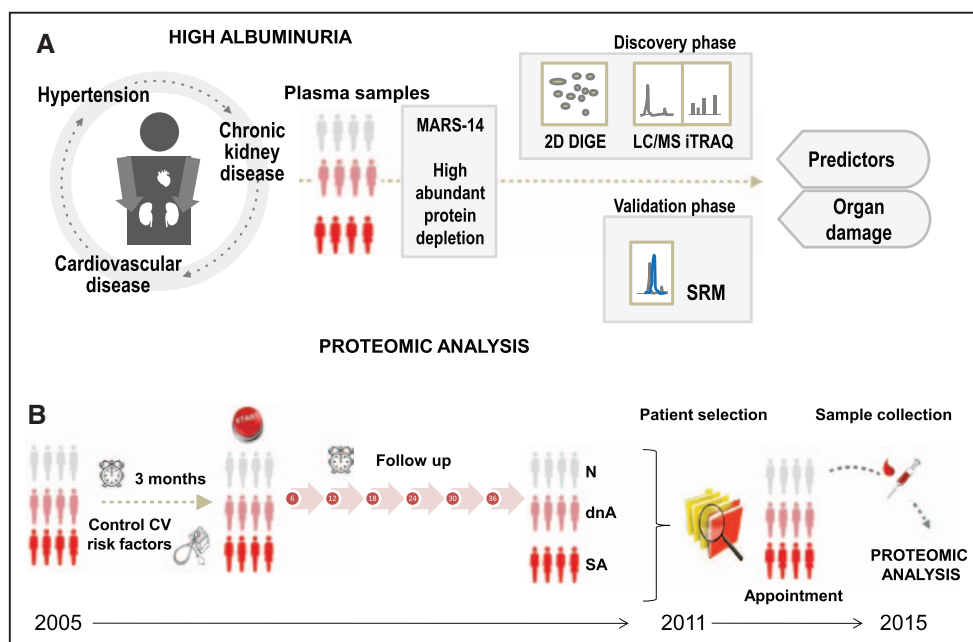
For the discovery phase, 24 HTA RAS patients were classified based on albumin/creatinine ratio in urine and development time of albuminuria in 3 groups: (1) normoalbuminuric patients (N); (2) de novo albuminuria (dnA), patients who developed de novo albuminuria in the past 10 years, and (3) patients with SA at baseline, which maintained elevated albuminuria levels during follow-up. Then, we confirmed these proteins in a cohort of patients with or without diabetes mellitus with the objective of verifying our findings in a general population. All the patients were matched by baseline characteristics and medications (Table S4 in the [online-only Data Supplement](#)).

In the validation phase, 105 patients were classified in the same groups as previously described. The clinical characteristics and medications of these hypertensive patients are shown in Table 2. A significant decrease of estimated glomerular filtration rate (ANOVA,  $P=0.004$ ) was observed for both albuminuric groups (dnA and SA), which implies impaired renal function associated with kidney damage.

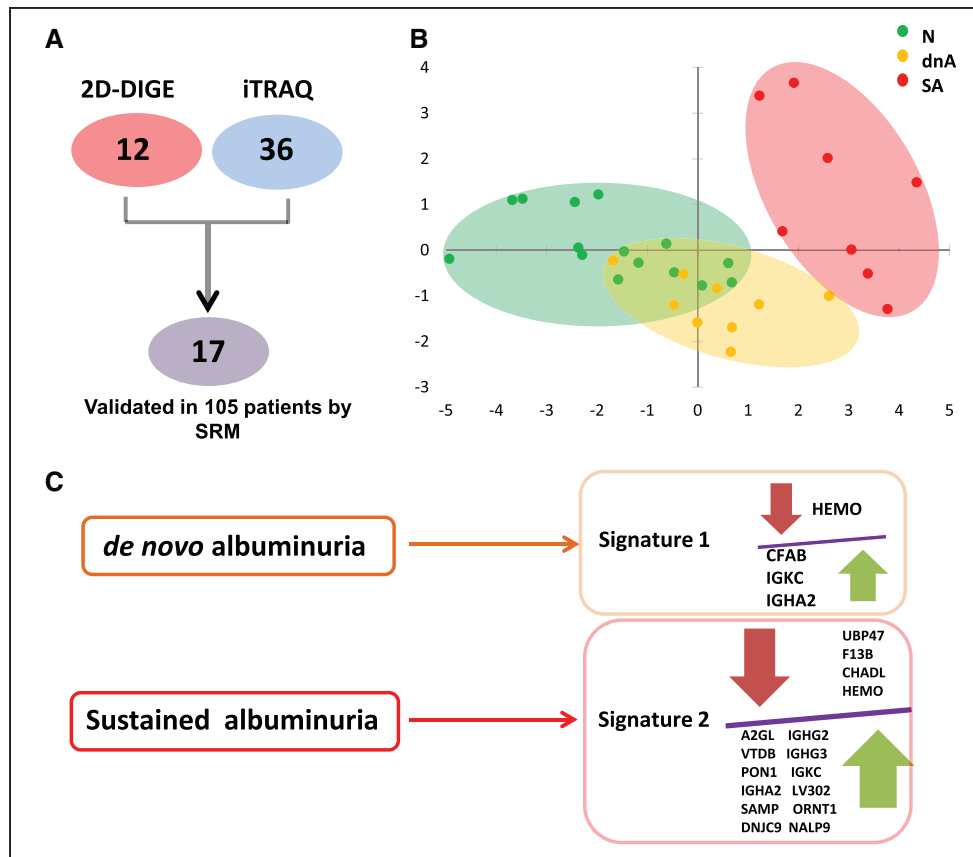
The study was conducted according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital 12 de Octubre ethics committee. In all cases, informed consent was requested from subjects indicating that their participation in the study was not prejudicial in any way to the treatment and possessed no risk.

### Proteomics Pipeline

The experimental strategy consisted of: (1) an immunodepletion of the 14 more abundant plasma proteins, (2) a discovery phase using 2 different, complementary, and robust proteomics techniques, 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE; GE-Healthcare) and isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) labeling (AB Sciex) followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry according to previous publications from our group,<sup>17</sup> and (3) a validation phase in an independent cohort of patients by selected reaction monitoring (SRM) analysis.<sup>18</sup> See details in the [online-only Data Supplement](#).



**Figure 1.** **A**, Experimental design based on omics strategy to approach the unbiased, nontargeted study of albuminuria in hypertensive patients searching for predictors and chronic organ damage markers in blood plasma. **B**, Schematic representation of the clinical monitoring of the 1433 patients during 3 years in the Hypertension Unit of Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain. The protocol includes a baseline study followed by 3-month period of stabilization. Patients were subsequently followed up during 3 years with visits to the unit every 6 months. The proteomics analysis started at the end of this period. CV indicates cardiovascular; SA, sustained albuminuria; and SRM, selected reaction monitoring.



**Figure 2.** **A**, Schematic picture of differentially expressed proteins identified by 2D-DIGE and iTRAQ and those validated by selected reaction monitoring (SRM). **B**, Principal component analysis where different groups were separated based on the 17 differentially expressed proteins validated by SRM. **C**, Two different plasma signatures, one of de novo albuminuria and the second of sustained high albuminuria are shown. dnA indicates de novo albuminuria; N, normoalbuminuria; and SA, sustained albuminuria.

For 2D-DIGE and iTRAQ experiments, we used 24 plasma samples ( $n=8$ , per group), which were combined to generate 4 sample pools per group (N1–N4, dnA1–dnA4, and SA1–SA4; Tables S2 and S3). In the SRM assay, we grouped the 105 plasma samples ( $N=53$ ,  $dnA=26$ , and  $SA=26$ ) into 32 pools (N1–N15, dnA1–dnA9, and SA1–SA8). The pool samples were perfectly grouped taking into account their clinical characteristics and albuminuria levels.

### Statistical Methods

Values for patients' characteristics are expressed as means $\pm$ SD or percentages. For all comparisons, 1-way ANOVA was used to calculate statistically significant differences of the values between the different groups studied. Post hoc analysis of significant ANOVA results was performed by means of Tukey analysis. For iTRAQ analysis, we have considered differentially expressed those proteins identified with at least 2 peptides and log2-ratios expressed in form of the standardized variables ( $Zq$ ) $\pm 2$  with  $P$  values  $\leq 0.05$ , being  $Zq$  the mean for the 4 replicates versus the normoalbuminuria group. In relation to 2D-DIGE analysis, we selected significant protein spots with a 1.3-fold difference in abundance between groups. For SRM, we have considered significant those peptides showing significant differences in at least 2 of the 3 analyzed transitions. In all cases, we have represented the transition of the most significant peptide. Receiver-operating characteristic (ROC) curves were generated using SPSS 15.0 for windows software (SPSS, Inc).

### Results

In this work, we investigated molecular changes involved in the development of albuminuria in the plasma proteome of

hypertensive patients with RAS suppression using different proteomics approaches (iTRAQ and 2D-DIGE). The use of an iTRAQ liquid chromatography–tandem mass spectrometry strategy has allowed us to perform one of the deepest plasma proteomic analyses to date, which led us to identify 4935 proteins, among which 36 were differentially expressed (Table S1). On the other hand, the 2D-DIGE analysis allows us to identify 12 differentially expressed proteins (Table S2 and Figure S1), which did not significantly expressed by iTRAQ. The combination of these two different and complementary proteomics techniques, in the discovery phase, guarantees a more extensive coverage of quantified proteins. Our results have allowed us to describe 5 differential proteins that had never been detected in plasma/serum to date, NALP9, UBP47, DNJC9, ORNT1, and CHADL, according to UniProt and The Human Protein Atlas databases, and therefore, low abundance proteins could be quantified by the hereby presented mass spectrometry–based strategy. To validate these alterations, 39 proteins were analyzed by SRM assay: the whole proteins found significantly expressed by 2D-DIGE and 27 proteins selected among the total varied in iTRAQ analysis, taking into account the fold change and their implication in molecular mechanisms related to the pathology. A total of 17 proteins were validated by SRM in an independent cohort of 105 subjects (Figure 2A; Table S3). Confirmed altered proteins were classified according to their biological functions (Table 1), as



**Table 1. Biological Functions of 17 Proteins Validated by SRM**

Protein Name	Abbreviation	Function	dnA/N	PValue	SA/dnA
				SA/N	
Ig $\gamma$ -3 chain C	IGHG3	Immune system response	...	$\uparrow 0.005$	$\uparrow 0.008$
Ig $\gamma$ -2 chain C	IGHG2	Immune system response	...	$\uparrow 9.29 \times 10^{-5}$	$\uparrow 0.014$
Ig $\alpha$ -2 chain C	IGHA2	Immune system response	$\uparrow 0.028$	$\uparrow 3.14 \times 10^{-4}$	...
Ig kappa chain C	IGKC	Immune system response	$\uparrow 0.014$	$\uparrow 0.008$	...
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	UBP47	Apoptosis	...	$\downarrow 6.17 \times 10^{-8}$	$\downarrow 2.5 \times 10^{-5}$
NACHT, LRR, and PYD domains-containing protein 9	NALP9	Inflammation	...	$\uparrow 4.6 \times 10^{-4}$	$\uparrow 0.002$
Dna J homolog subfamily C member 9	DNJC9	Apoptosis	...	$\uparrow 5.87 \times 10^{-6}$	$\uparrow 4.24 \times 10^{-6}$
Chondroadherin-like protein	CHADL	Chondrocyte differentiation	...	$\downarrow 0.003$	$\downarrow 0.002$
Ig $\lambda$ chain V-III region LOI	LV302	Immune system response	...	$\uparrow 0.020$	...
Mitochondrial ornithine transporter 1	ORNT1	Metabolic process	...	...	$\uparrow 0.020$
Vitamin D-binding protein	VTDB	Lipid binding	...	$\uparrow 1.62 \times 10^{-6}$	$\uparrow 1.09 \times 10^{-5}$
Complement factor B	CFAB	Immune system response	$\uparrow 0.012$	...	...
Coagulation factor XIII B chain	F13B	Coagulation	...	$\downarrow 6.219 \times 10^{-6}$	$\downarrow 0.003$
Hemopexin	HEMO	Inflammation	$\downarrow 0.051$	$\downarrow 0.040$	...
Leucine-rich $\alpha$ -2-glycoprotein	A2GL	Inflammation	...	$\uparrow 0.001$	$\uparrow 8.23 \times 10^{-5}$
Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	Inflammation	...	$\uparrow 4.31 \times 10^{-7}$	$\uparrow 1.13 \times 10^{-5}$
Serum amyloid P-component	SAMP	Inflammation	...	$\uparrow 0.002$	$\uparrow 0.001$

dnA indicates de novo albuminuria; LOI, no leucine-rich motif; N, normoalbuminuria; NACHT, NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), C2TA (MHC class 2 transcription), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*), and TP1 (telomerase-associated protein); LRR, leucine-rich-repeat; PYD, protein pyrin domain; SA, sustained albuminuria; and SRM, selected reaction monitoring.

we said before. Besides, these proteins were analyzed using ROC curves, a useful tool, which allow us to discriminate the different groups of study attending to their protein expression levels. The principal component analysis has shown a correct grouping of patients with SA respect to the other 2 groups (Figure 2B). The differential proteomic analysis has revealed 2 different signatures; one of them are candidates markers of de novo albuminuria, which are formed by 4 out of the 17 proteins validates by SRM, and the second one, may be considered markers of end organ damage because their levels are altered in sustained albuminuric patients and made up of 16 proteins (3 already varied in dnA) (Figure 2C).

### Plasma Proteomic Signature With Predictive Value of De Novo Albuminuria

SRM results have shown the upregulation of 3 proteins involved in immune response: CFAB, IGKC, and IGHA2 (Figure 3A) and a decrease in HEMO (Figure 3B). ROC curve for these 4 proteins showed a significant classification value ( $P=0.003$ ) of this panel for the separation of dnA patients with respect to N, with a considerably high AUC of 0.874 (Figure 4A).

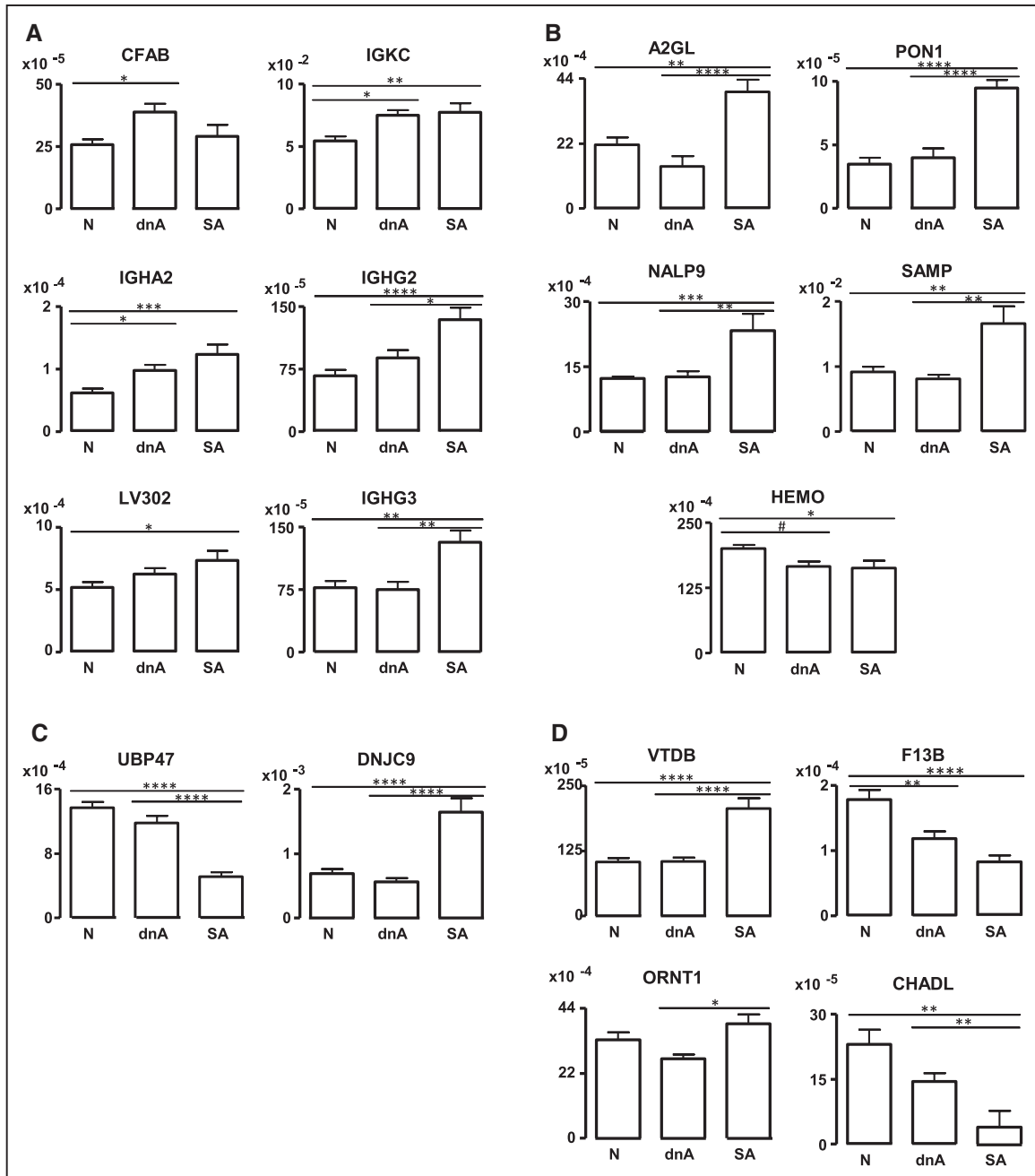
### Panel of Protein Markers of SA

SRM results have shown a total of 5 upregulated plasma proteins involved in immune response (IGKC, LV302, IGHA2, IGHG2, and IGHG3; Figure 3A), among which 2 of them (IGKC and IGHA2) were found previously altered in SA. In addition, 5 altered proteins related with inflammation (A2GL, PON1, SAMP, NALP9, and HEMO; Figure 3B), 2 involved in ERS

(UBP47 and DNJC9; Figure 3C), and other 4 proteins with different functions, such as vitamin D transport, blood coagulation, urea cycle, and chondrocyte differentiation (VTDB, ORNT1, F13B, and CHADL, respectively) were found altered in sustained albuminuric patients (SA; Figure 3D). Moreover, ROC curves have shown a good sensitivity and specificity (AUC=1) indicating that these panels of proteins could discriminate sustained albuminuric patients from normoalbuminurics with a significant classification value ( $P=1.07 \times 10^{-5}$ ; Figure 4B–4E).

## Discussion

During the past 20 years, the proteomic evolution has included a better understanding of the need to consider cardiovascular proteomics that resolve, identify, and elucidate cardiovascular disease process.<sup>19</sup> Regarding this, we performed 2 complementary proteomic approaches to analyze plasma in order to search for potential indicators for an adequate risk assessment in hypertensive patients under chronic RAS suppression. With this purpose, we analyzed 3 groups of patients: N, dnA, and SA with a different response to RAS suppression, therefore exploring underlying mechanisms of albuminuria development associated to inefficient therapeutic response. We have found a total number of 48 differentially expressed proteins, of which 17 were subsequently confirmed by SRM in an independent cohort of 105 patients. We selected this approach taking into account that previous studies developed in our laboratory have shown the same result in the validation of proteins analyzed by Western blot and by SRM.<sup>20,21</sup> The proteomic alterations observed have allowed us to molecularly



**Figure 3.** Validation of 17 proteins by selected reaction monitoring (SRM). **A**, Panel of proteins related with immune response. **B**, Proteins involved in inflammation. **C**, Proteins related with endoplasmic reticulum stress. **D**, Proteins with other functions. In the bar charts, we have represented normalized area of the transition of the most significant peptide. dnA indicates de novo albuminuria; N, normoalbuminuria; and SA, sustained albuminuria. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; # $P = 0.051$ .

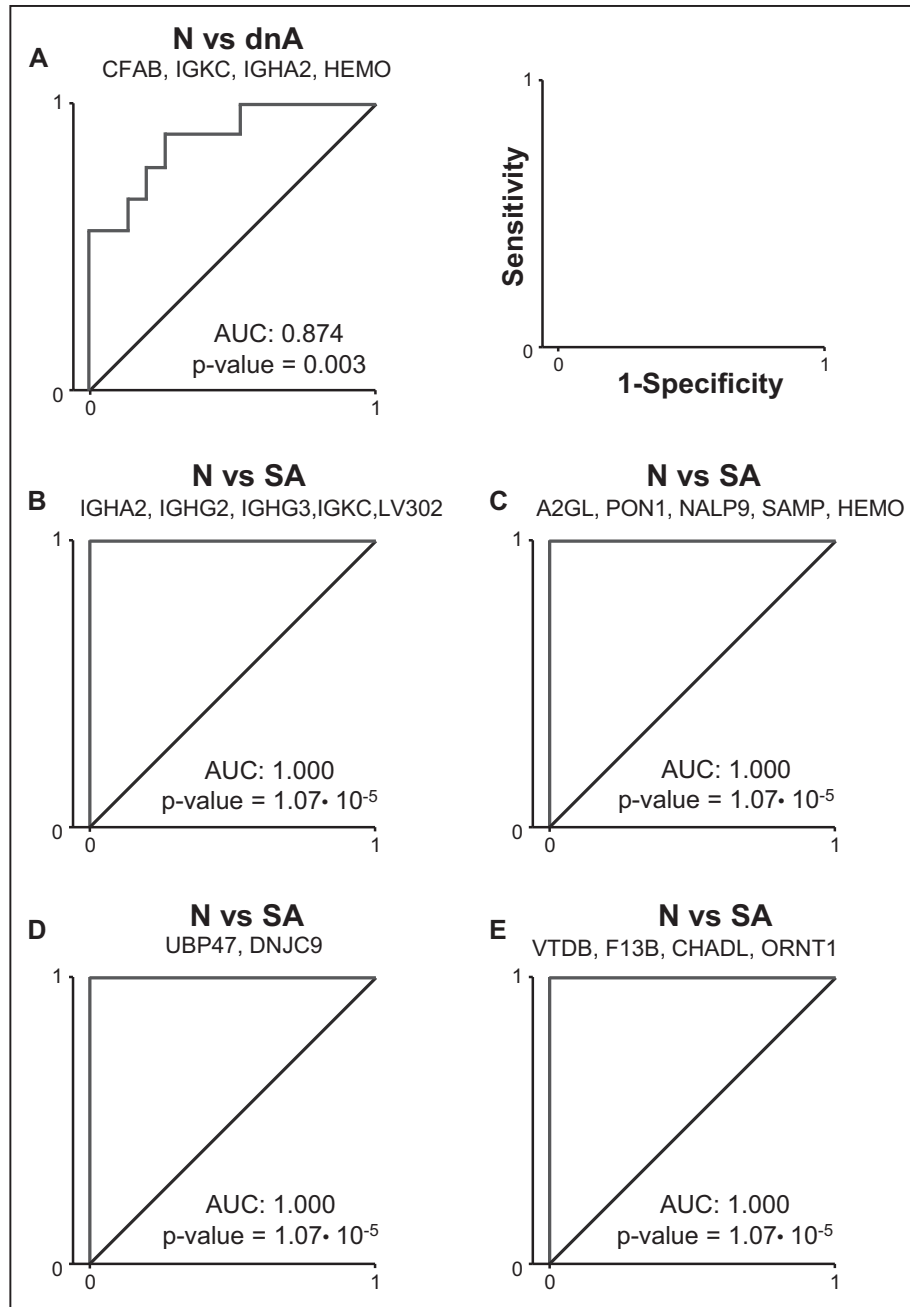
characterize several processes involved in albuminuria development and hence associated with cardiorenal risk (Figure 5).

The great majority of these 17 proteins are involved in immune response, inflammation, and ERS, pointing to the activation of these processes in albuminuric patients. Moreover, ROC curves, of great utility for evaluating diagnostic tests, have shown good sensitivity and selectivity for these protein markers, which prove the potential value of these indicators to classify hypertensive patients according to albuminuria onset.

A panel of 4 proteins (CFAB, IGKC, IGHA2, and HEMO) has shown alterations in plasma levels from patients who

developed de novo albuminuria compared with those remaining normoalbuminurics. Therefore, these proteins might have a potential predictive value for the development of albuminuria, which is furthermore enhanced by the ROC curve comparing dnA versus N (Figure 4A). CFAB, a component of innate response, is the only protein that exclusively appears in the group of de novo albuminuria, and its basal levels are subsequently recovered in sustained albuminuric patients. Previous studies have reported that innate immunity is activated in early stages of hypertension and end organ damage.<sup>22</sup> Similar findings have been described in different types of renal diseases.<sup>23,24</sup>



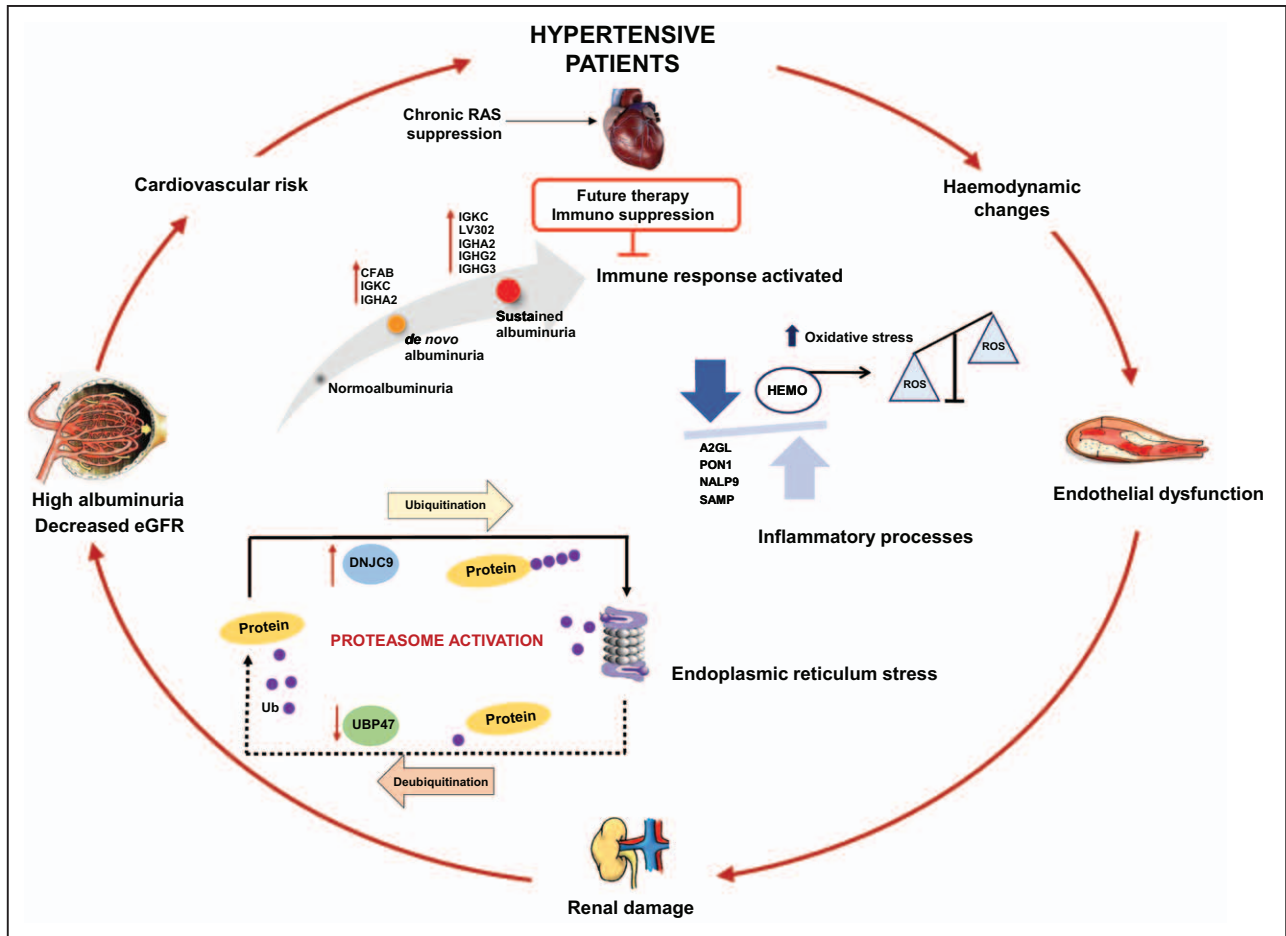


**Figure 4.** Receiver-operating characteristic (ROC) curves for classification of patients with de novo albuminuria (dnA) and sustained albuminuria (SA) vs normoalbuminurics (N). **A**, Proteins with predictive value of dnA. **B–E**, Protein markers of SA involved in the immune system (**B**), inflammation (**C**), and endoplasmic reticulum stress (**D**), and proteins involved in other functions (**E**). Area under the ROC curve (AUC) with 95% confidence intervals was calculated, and  $P$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

Analogous mechanisms may account for the observed increase of CFAB in plasma from de novo albuminuric patients.

On the contrary, we have found a different proteomic signature made up of 16 proteins, indicators of SA, whose levels may be related to persistent chronic organ damage. It is important to note that 3 of these 16 proteins were already found altered in dnA patients (IGKC, IGHA2, and HEMO). These data show the augment of 2 immunoglobulins at an earlier stage of the pathogenesis which remained altered in more advanced stages, indicating that their upregulation persists after the development of albuminuria. The increased levels

of these 5 immunoglobulins in albuminuric patients could reflect intraglomerular inflammatory conditions contributing to an increase in glomerular permeability allowing the passage of albumin into the urine in such (a significant decrease of estimated glomerular filtration rate in patients is shown in Table 2). Similar increases in permeability should be taking place simultaneously in systemic vasculature.<sup>25</sup> A greater activation of this immune response involving LV302, IGHG2, and IGHG3 is observed and probably participates in albuminuria persistence. In fact, an activation of immune cells associated with impaired renal function in patients with chronic kidney



**Figure 5.** The activation immune system in hypertensive patients with high albuminuria under chronic renin–angiotensin system (RAS) suppression. Mechanisms involved in the pathogenesis of renal damage and functional implication of observed protein alterations related with immune response, inflammation, and apoptosis. The immune suppression as future therapy could prevent the progression of kidney damage. eGFR indicates estimated glomerular filtration rate; ROS, reactive oxygen species; and Ub, ubiquitin.

disease has been previously described.<sup>26</sup> In addition, serum free light chains such as IGKC and LV302 have been associated with renal failure because of their accumulation in plasma as a result of inefficient clearing by the kidneys leading to GFR decrease.<sup>27</sup> Furthermore, the immune system plays a critical role in modulating renal injury through activation of cytokines and mediators of inflammation.<sup>28</sup>

Moreover, a subset of 5 proteins (A2GL, SAMP, NALP9, HEMO, and PON1) related to inflammation processes has also been found altered in patients with SA, which seems related to the presence of persistent renal damage inferred by the observed significant decrease of estimated glomerular filtration rate (Table 2). These findings may suggest that, while kidney damage progresses, an enhanced inflammatory process is triggered leading to an alteration of the levels of these proteins observed in plasma that simultaneously contribute to progression of systemic atherosclerosis.<sup>29–32</sup> In addition, HEMO plays an important antioxidant role,<sup>33,34</sup> and a decrease of this protein could participate in worsening the endothelial dysfunction present in these patients, therefore increasing cardiovascular risk and renal damage. In fact, our previous studies showing an increased oxidative damage in albuminuric patients support this finding.<sup>14</sup>

Another group consisting of 2 proteins (UBP47 and DNJC9) has been involved in the proteasome activation in situations of ERS. In the progression of CKD, albumin overload leads to ERS in the kidney, which has been associated with apoptosis of proximal tubular cells.<sup>35</sup> A defective proximal reabsorption of albumin can be invoked and explained through this proximal tubular damage.<sup>36</sup> Altered levels of UB47 and DNJC9 in SA patients point to the activation of a defense mechanism to counteract ERS, responsible for the degradation of misfolded proteins by the proteasome. The upregulation of DNJC9 in SA patients could be directly involved in the ubiquitination tagging of misfolded proteins driving their degradation by the proteasome, whereas UB47 is a deubiquitinase, which is involved in the opposite process to that of DNJC9, whose decrease also favors proteasome-mediated degradation. The activation of the ubiquitination-proteasome system may not be able to compensate ERS, which has been shown to lead to glomerular injury triggered by the activation of apoptotic pathways in the kidney as a consequence of stress conditions.<sup>37</sup> ROC curve for UB47 and DNJC9 has shown a perfect classification of SA with an AUC of 1 (Figure 4D), and considering that these proteins had never been detected in plasma to date, this result points to a great potential of these 2

**Table 2. Demographic Data and Clinical Characteristics of the Study Population Recruited for the Validation Phase**

Variable	N (n=53)	dnA (n=26)	SA (n=26)	P Value
Age, y	64±11	69±8	66±11	0.264
Male sex, %	40	70	70	0.005*
BMI, kg/m <sup>2</sup>	30±4	30±5	30±4	0.966
Current smoking, %	9	15	11	0.743
Albumin/creatinine, mg/g	7.61±6.67	116±126	371±573	0.000006†
Creatinine clearance rate, mg/mL	165±38	87±48	80±39	0.405
eGFR, mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	81±17	68±20	67±26	0.004*
Total cholesterol, mg/dL	186±29	166±26	168±26	0.003*
Triglycerides, mg/dL	123±50	137±36	131±71	0.583
HDL cholesterol, mg/dL	55±12	50±10	47±13	0.018*
LDL cholesterol, mg/dL	106±27	89±19	97±18	0.010*
Glycemia, mg/dL	118±40	127±26	118±33	0.583
Uric acid, mg/dL	5±2	6±2	7±2	0.000*
Systolic blood pressure, mm Hg	139±18	136±20	141±28	0.663
Diastolic blood pressure, mm Hg	82±11	80±10	83±14	0.761
Diabetes, %	38	62	54	0.107
ACEi, %	17 (n=9)	20 (n=5)	27 (n=7)	0.580
ARB, %	83 (n=44)	80 (n=21)	73 (n=19)	0.580
Diuretic, %	23	35	54	0.022*
Calcium channel blocker, %	47	46	61	0.428
β Blocker agent, %	26	35	27	0.733
α Blocker agent, %	17	35	19	0.191
Anticoagulant, %	40	50	31	0.366
Lipid-lowering agents, %	74	69	81	0.627
Antidiabetic agent, %	26	42	38	0.302

Values are expressed as mean±SD or percentages (%). ACEi indicates angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB, angiotensin receptor blockers; BMI, body mass index; dnA, de novo albuminuria; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HDL, high-density lipoprotein cholesterol; LDL, low-density lipoprotein cholesterol; N, normoalbuminuria; and SA, sustained albuminuria.

Statistical significance was accepted at \* $P<0.05$ ; † $P<0.01$ .

novel plasma proteins for monitoring renal function in hypertensive patients.

The hereby reported results show that hypertensive subjects who develop albuminuria under chronic RAS suppression exhibit an early activation of the immune response reflected by the increase of 2 immunoglobulins (IGHA2 and IGKC). During albuminuria progression, a greater immune activation is observed, since elevated levels of these 2 immunoglobulins together with 3 more: IGHG2, IGHG3 and LV302, were detected, which might be involved in the progressive renal damage observed. In addition, ROC curve value for this subset of immunoglobulins showed a correct classification of sustained albuminuric patients with respect to normoalbuminurics.

In this sense, our results are in line with previous studies pointing to a determinant role of the immune response in the pathogenesis of hypertension<sup>38</sup> and also provide additional

molecular data showing particular immunoglobulins altered with albuminuria. Thus, the upregulation of proteins involved in the immune system in patients with albuminuria could elucidate specific molecular pathways involved in the pathogenesis of organ damage, as well as support a hypothesis with increasing approval in the scientific community pointing to the great potential of a future strategy based on anti-immune therapy to treat hypertension.<sup>27</sup> In fact, hypertensive rats treated with this therapy showed increased glomerular filtration rate, decreased urinary protein excretion,<sup>39</sup> and reduced blood pressure, inflammation, and ROS,<sup>40</sup> which supports its potential to prevent the development of albuminuria and hence the progression of kidney damage.

In this work, we show the great potential of plasma proteomics to discover novel indicators of early albuminuria and end organ damage in hypertensive patients under RAS suppression and provide new proteins present in plasma together

with a subset of promising markers of albuminuria to the high AUC values observed. Some limitations of our study are the use of pools for the proteomic analysis and the necessity to increase the number of patients to confirm the potential value of the hereby described protein indicators. Future functional analysis will be necessary to study the potential role of these proteins in the development of albuminuria and therefore in the progression of cardiovascular and renal diseases. Moreover, a prospective study will be required to determine the clinical utility of these proteins as potential biomarkers which could allow distinguishing 2 stages in the evolution of albuminuric patients chronically RAS suppressed. Strategies to stimulate reverse translation from clinical observations to the bench and to better merge clinical and basic science projects to facilitate translation are also needed.<sup>19</sup>

## Perspectives

The main goal of this study was to identify different proteomic signatures able to elucidate specific molecular pathways involved in the pathogenesis. These proteins could be potential predictors and chronic organ damage indicators in albuminuric patients during chronic renin angiotensin suppression and hence, could contribute to identifying patients with increased cardiovascular risk when clinical predictors as albuminuria are still in the normal range, and this makes possible to adapt, better and earlier, the pharmacological intervention for those individuals at higher risk. According to these considerations, the key point of our study is that we provide the discovery of 2 different protein profiles which could allow distinguishing 2 stages in the evolution of albuminuric patients. Furthermore, these results open the possibility of a future strategy based on anti-immune therapy to treat hypertension which could help to prevent the development of albuminuria and hence the progression of kidney damage.

## Sources of Funding

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI070537, IF08/3667-1, PI11-02239, PI14/01917, PI11/01401, PI11/02432, PI13/01873, PI13/01746, PI13/01581, PI14/01650, and PI14/01841); by PT13/0001/0013, PIE13/00051, PIE13/00045, CP09/00229, IDCSalud (3371/002) Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, Fundación Senefro CP15/00129 and Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (FONDOS FEDER, RD06/0014/1015, RD12/0042/0071). The drawings have been obtained by 100 viñetas sobre hipertensión, 2013. Daiichi-Sankyo, which is an original idea of this company for hypertension publications. These results are lined up with the Spanish initiative on the Human Proteome Project.

## Disclosures

R.M. Ruilope has served as advisor/speaker for Astra-Zeneca, Bayer, Daiichi-Sankyo, Medtronic, Novartis, Pfizer, Relypsa, Sanofi, and Takeda. The other authors report no conflicts.

## References

1. Noyes AM, Eckardt K. Microalbuminuria as a risk factor for cardiovascular disease in healthy individuals: a case report and review of the literature. *Conn Med*. 2013;77:399–402.
2. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, et al; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet*. 2012;380:1662–1673. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61350-6.

3. Abdelhafiz AH, Ahmed S, El Nahas M. Microalbuminuria: marker or maker of cardiovascular disease. *Nephron Exp Nephrol*. 2011;119(suppl 1):e6–e10. doi: 10.1159/000328015.
4. Crippa G. Microalbuminuria in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2002;16 (suppl 1):S74–S77. doi: 10.1038/sj.jhh.1001348.
5. Siddiqi FS, Advani A. Endothelial-podocyte crosstalk: the missing link between endothelial dysfunction and albuminuria in diabetes. *Diabetes*. 2013;62:3647–3655. doi: 10.2337/db13-0795.
6. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev*. 2008;88:451–487. doi: 10.1152/physrev.00055.2006.
7. Salmon AH, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol*. 2012;226:562–574. doi: 10.1002/path.3964.
8. Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, et al; Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004;351:1941–1951. doi: 10.1056/NEJMoa042167.
9. Haller H, Ito S, Izzo JL, Jr, Januszewicz A, Katayama S, Menne J, Mimran A, Rabelink TJ, Ritz E, Ruilope LM, Rump LC, Viberti G; ROADMAP Trial Investigators. Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2011;364:907–917. doi: 10.1056/NEJMoa1007994.
10. Ravid M, Savin H, Jutrin I, Bental T, Katz B, Lishner M. Long-term stabilizing effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on plasma creatinine and on proteinuria in normotensive type II diabetic patients. *Ann Intern Med*. 1993;118:577–581.
11. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998;97:1411–1420.
12. Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karlberg B, Madsbad S, Jervell J, Mustonen J; Diabetes Exposed to Telmisartan and Enalapril Study Group. Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2004;351:1952–1961. doi: 10.1056/NEJMoa042274.
13. Cerezo C, Ruilope LM, Segura J, Garcia-Donaire JA, de la Cruz JJ, Banegas JR, Waeber B, Rabelink TJ, Messerli FH. Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system suppression. *J Hypertens*. 2012;30:204–209. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834d9e0f.
14. Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguez I, Del Carmen González M, Arribas S, Cerezo C, Segura J, Praga M, Fernández-Alfonso MS, Ruilope LM. Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens*. 2014;32:2082–2091; discussion 2091. doi: 10.1097/HJH.0000000000000292.
15. Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Segura J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:8. doi: 10.1186/s12933-016-0331-7.
16. Baldan-Martin M, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Moreno-Luna R, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Segura J, Padial LR, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics. *Int J Cardiol*. 2015;196:170–177. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.148.
17. Alonso-Organ S, Martin-Rojas T, Calvo E, López JA, Vivanco F, Barderas MG. Differential protein expression analysis of degenerative aortic stenosis by iTRAQ labeling. *Methods Mol Biol*. 2013;1005:109–117. doi: 10.1007/978-1-62703-386-2\_9.
18. Dardé VM, Barderas MG, Vivanco F. Multiple reaction monitoring (MRM) of plasma proteins in cardiovascular proteomics. *Methods Mol Biol*. 2013;1000:191–199. doi: 10.1007/978-1-62703-405-0\_14.
19. Lindsey ML, Mayr M, Gomes AV, Delles C, Arrell DK, Murphy AM, Lange RA, Costello CE, Jin YF, Laskowitz DT, Sam F, Terzic A, Van Eyk J, Srinivas PR; American Heart Association Council on Functional Genomics and Translational Biology, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Hypertension, and Stroke Council. Transformative impact of proteomics on cardiovascular health and disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;132:852–872. doi: 10.1161/CIR.0000000000000226.
20. Laborde CM, Alonso-Organ S, Mourino-Alvarez L, Moreu J, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. The plasma proteomic signature as a

- strategic tool for early diagnosis of acute coronary syndrome. *Proteome Sci.* 2014;12:43. doi: 10.1186/1477-5956-12-43.
21. Martín-Rojas T, Mourino-Alvarez L, Alonso-Organ S, Rosello-Lleti E, Calvo E, Lopez-Almodovar LF, Rivera M, Padial LR, Lopez JA, de la Cuesta F, Barderas MG. iTRAQ proteomic analysis of extracellular matrix remodeling in aortic valve disease. *Sci Rep.* 2015;5:17290. doi: 10.1038/srep17290.
  22. De Miguel C, Rudemiller NP, Abais JM, Mattson DL. Inflammation and hypertension: new understandings and potential therapeutic targets. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17:507. doi: 10.1007/s11906-014-0507-z.
  23. Kitzler TM, Papillon J, Guillemette J, Wing SS, Cybulsky AV. Complement modulates the function of the ubiquitin-proteasome system and endoplasmic reticulum-associated degradation in glomerular epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823:1007–1016. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.001.
  24. Sacks S, Zhou W. New boundaries for complement in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:1865–1869. doi: 10.1681/ASN.2007101121.
  25. Bakris GL, Molitch M. Microalbuminuria as a risk predictor in diabetes: the continuing saga. *Diabetes Care.* 2014;37:867–875. doi: 10.2337/dc13-1870.
  26. Schmaderer C, Heemann U. Blocking innate immunity to slow the progression of chronic kidney disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014;387:905–907. doi: 10.1007/s00210-014-1031-z.
  27. Hutchison CA, Burmeister A, Harding SJ, Basnayake K, Church H, Jesky MD, White K, Green CE, Stringer SJ, Bassett P, Ferro CJ, Cockwell P. Serum polyclonal immunoglobulin free light chain levels predict mortality in people with chronic kidney disease. *Mayo Clin Proc.* 2014;89:615–622. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.01.028.
  28. Leventhal JS, He JC, Ross MJ. Autophagy and immune response in kidneys. *Semin Nephrol.* 2014;34:53–61. doi: 10.1016/j.semnephrol.2013.11.008.
  29. Mason JC, Libby P. Cardiovascular disease in patients with chronic inflammation: mechanisms underlying premature cardiovascular events in rheumatologic conditions. *Eur Heart J.* 2015;36:482–49c. doi: 10.1093/eurheartj/ehu403.
  30. de la Cuesta F, Zubiri I, Maroto AS, Posada M, Padial LR, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Barderas MG. Deregulation of smooth muscle cell cytoskeleton within the human atherosclerotic coronary media layer. *J Proteomics.* 2013;82:155–65.
  31. de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Maroto AS, Donado A, Zubiri I, Posada M, Padial LR, Pinto AG, Barderas MG, Vivanco F. A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10:M110.003517. doi: 10.1074/mcp.M110.003517.
  32. Barderas MG, Tuñón J, Dardé VM, De la Cuesta F, Jiménez-Nácher JJ, Tarín N, López-Bescós L, Egido J, Vivanco F. Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics.* 2009;9:1982–1993. doi: 10.1002/pmic.200700583.
  33. Gutteridge JM, Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J.* 1988;256:861–865.
  34. Vinchi F, De Franceschi L, Ghigo A, Townes T, Cimino J, Silengo L, Hirsch E, Altruda F, Tolosano E. Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation.* 2013;127:1317–1329. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.130179.
  35. Ohse T, Inagi R, Tanaka T, Ota T, Miyata T, Kojima I, Ingelfinger JR, Ogawa S, Fujita T, Nangaku M. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006;70:1447–1455. doi: 10.1038/sj.ki.5001704.
  36. Rabelink TJ, de Zeeuw D. The glycocalyx—linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11:667–676. doi: 10.1038/nrneph.2015.162.
  37. Cybulsky AV. The intersecting roles of endoplasmic reticulum stress, ubiquitin-proteasome system, and autophagy in the pathogenesis of proteinuric kidney disease. *Kidney Int.* 2013;84:25–33. doi: 10.1038/ki.2012.390.
  38. Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Johnson RJ. The immunological basis of hypertension. *Am J Hypertens.* 2014;27:1327–1337. doi: 10.1093/ajh/hpu142.
  39. Tian N, Gu JW, Jordan S, Rose RA, Hughson MD, Manning RD, Jr. Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1018–H1025. doi: 10.1152/ajpheart.00487.2006.
  40. Bomfim GF, Echem C, Martins CB, Costa TJ, Sartoretto SM, Dos Santos RA, Oliveira MA, Akamine EH, Fortes ZB, Tostes RC, Webb RC, Carvalho MH. Toll-like receptor 4 inhibition reduces vascular inflammation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2015;122:1–7. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.001.

## Novelty and Significance

### What Is New?

- The combination of 2 complementary proteomic approaches to analyze plasma has identified new potential predictors of renal damage and de novo albuminuria indicators. These protein signatures could allow us to monitor albuminuria in hypertensive patients with suppression of renin-angiotensin system.

### What Is Relevant?

- The main question is that evolution of hypertensive patients who are chronically treated to control blood pressure is unpredictable in terms of albuminuria development. Thus, this is a clinical question of extreme importance, and there are no current studies on it apart from previous research from our group.<sup>14–16</sup> The proteomic analysis has allowed identifying 2 proteomic signatures involved in the development of de novo and sustained albuminuria, which are related to inflammation, immune

response, and endoplasmic reticulum stress. The relevance of our findings is that this strategy may contribute to adequate risk assessment and earlier intervention and better outcome of these patients.

### Summary

High prevalence of albuminuria in patients chronically renin-angiotensin system suppressed has been demonstrated, and currently, there are no available markers able to predict evolution of these chronically treated patients. Our strategy allowed us to perform one of the deepest plasma proteomic analysis to date which has shown 2 proteomic signatures: (1) with predictive value of de novo albuminuria and (2) sustained albuminuria indicator proteins.



# Kalirin and CHD7: novel endothelial dysfunction indicators in circulating extracellular vesicles from hypertensive patients with albuminuria

**Fernando de la Cuesta<sup>1,6</sup>, Montserrat Baldan-Martin<sup>1</sup>, Rafael Moreno-Luna<sup>1</sup>, Gloria Alvarez-Llamas<sup>2</sup>, Laura Gonzalez-Calero<sup>2</sup>, Laura Mourino-Alvarez<sup>1</sup>, Tamara Sastre-Oliva<sup>1</sup>, Juan A. López<sup>3</sup>, Jesús Vázquez<sup>3</sup>, Gema Ruiz-Hurtado<sup>4</sup>, Julian Segura<sup>4</sup>, Fernando Vivanco<sup>2,5</sup>, Luis M. Ruilope<sup>4</sup>, Maria G. Barderas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Vascular Physiopathology, Hospital Nacional de Paraplejicos (HNP), SESCAM, Toledo, Spain

<sup>2</sup>Department of Immunology, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Unidad de Proteomica CNIC, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Unidad de Hipertension, Instituto de Investigacion i + 12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>6</sup>Current address: Centre for Cardiovascular Science, Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

**Correspondence to:** Maria G. Barderas, **email:** megonzalezb@sescam.jccm.es

Luis M. Ruilope, **email:** ruilope@ad-hocbox.com

**Keywords:** *extracellular vesicles, proteomics, endothelial dysfunction, hypertension, albuminuria*

**Received:** August 17, 2016

**Accepted:** December 05, 2016

**Published:**

## ABSTRACT

**Despite of the great advances in anti-hypertensive therapies, many patients under Renin-Angiotensin- System (RAS) suppression develop albuminuria, which is a clear indicator of therapeutic inefficiency. Hence, indicators of vascular function are needed to assess patients' condition and help deciding future therapies.**

**Proteomic analysis of circulating extracellular vesicles (EVs) showed two proteins, kalirin and chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 (CHD7), increased in albuminuric patients. A positive correlation of both with the expression of the endothelial activation marker E-selectin was found in EVs. *In vitro* analysis using TNF $\alpha$ -treated adult human endothelial cells proved their involvement in endothelial cell activation.**

**Hence, we propose protein levels of kalirin and CHD7 in circulating EVs as novel endothelial dysfunction markers to monitor vascular condition in hypertensive patients with albuminuria.**

## INTRODUCTION

Albuminuria has been associated with increased cardiovascular (CV) risk and allows monitoring therapeutic efficiency in hypertensive patients, since a substantial number of them develop de novo albuminuria despite of the RAS suppression treatment [1]. These patients show a characteristic inflammatory signature in both plasma [2, 3] and urine [4]. In this context, increased shear stress, endothelial dysfunction [5] and oxidative stress [6] in the whole circulatory system arises and therefore additional therapies need to be addressed to prevent future events and avoid organ damage.

EVs are membrane vesicles released by secreting cells to communicate with other cells. These vesicles

are a very useful tool to understand the processes taking place in the secreting cell, especially in pathological conditions, in which its release is enhanced [7]. EVs include two different types of vesicles: 1) microvesicles (MVs), 50 nm-1  $\mu$ m vesicles which bud directly from the plasma membrane; and 2) exosomes: 50–120 nm vesicles released by fusion of multivesicular endosomes (MVEs) to the plasma membrane [8]. EVs derived by either platelets (PEVs) or endothelial cells (EEVs) are shed to the bloodstream and increased number of both has been associated with increased CV risk [9]. Furthermore, an increased number of apoptotic endothelial EVs has been recently reported in hypertensive patients with albuminuria [10] and increased shear stress might be the major cause of such increase.

Circulating EVs may therefore constitute a low-invasive tool for analysing the pathogenic processes triggered by albuminuria. Using differential proteomic analysis we have been able to identify kalirin and CHD7 to be increased in EVs from albuminuric patients. *In vitro* analysis showed and proved their involvement in endothelial cell (EC) activation within blood vessels. Thus, we propose protein levels of kalirin and CHD7 in circulating EVs as novel endothelial dysfunction markers in hypertensive patients with albuminuria.

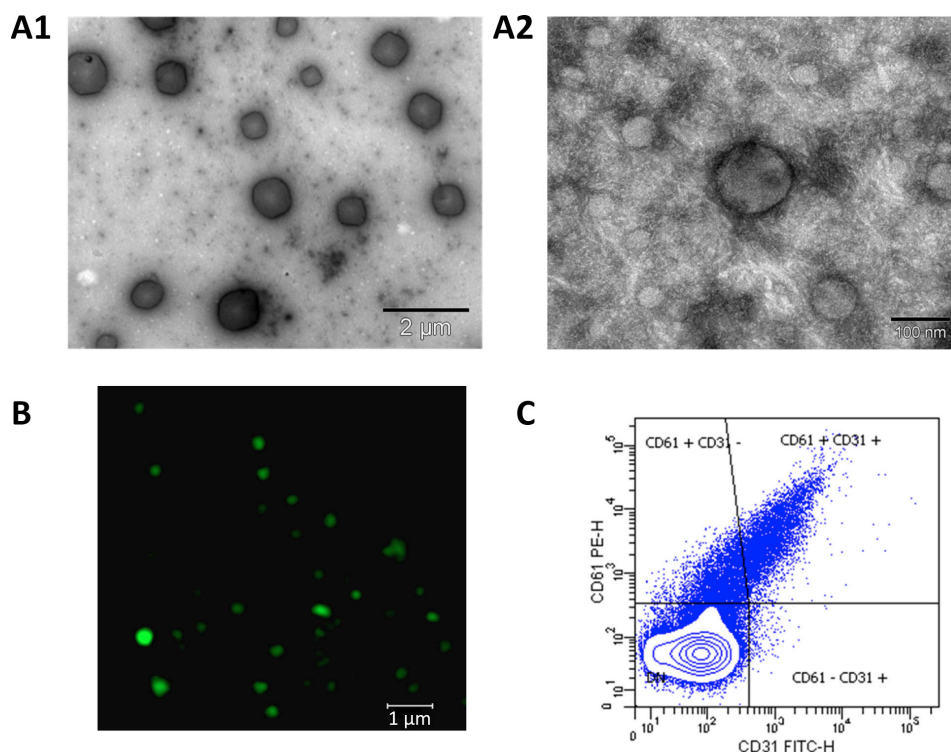
## RESULTS

### Efficient isolation of EVs from blood of hypertensive patients

The EV fraction obtained after isolation by ultracentrifugation was checked by EM, confocal microscopy and flow cytometry. EM results showed presence of vesicles ranging from 50 nm – 1  $\mu$ m size, which corresponded to both exosomes and MVs (Figure 1, A1 and A2). Most abundant CD61<sup>+</sup> PEVs were imaged by confocal microscopy (Figure 1B) and these, together with CD61<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> EMVs were detected by flow cytometry (Figure 1C).

### Differential analysis of EVs from hypertensive patients with albuminuria

Differential abundance analysis was performed by means of iTRAQ labelling and LC-MS/MS. To focus in the alterations occurring with albuminuria onset, two different groups attending to albuminuria development were independently analysed: a) patients developing de novo albuminuria during follow-up (dnA); b) patients with sustained albuminuria during follow-up (SA) and a normoalbuminuric group was used as control (N). Results showed 20 proteins significantly altered, among which 19 were found in any of the albuminuric groups, compared to the normoalbuminuric (Supplementary Table S3). A principal component analysis (PCA) and heatmap (Figure 2A and 2B) were performed using these differential proteins. In the PCA (Figure 2A) the first principal component greatly separates normoalbuminuric patients from the albuminuric patients, showing the EVs from normoalbuminuric patients express very different levels of proteins to those of the albuminuric. All proteins were searched in two EVs databases: Vesiclepedia and EVpedia, for prior evidence of expression by EVs, either MVs or exosomes. Fourteen of them have been previously reported to be expressed by EVs at the protein level,



**Figure 1: Isolation of EVs from blood plasma of hypertensive patients.** Electron microscopy allowed to check presence of all range of EVs: (A1), (15,000 $\times$  magnification, scale bar 2  $\mu$ m) vesicles of 0.1–1  $\mu$ m size (microvesicles, MVs). (A2), (200,000 $\times$  magnification, scale bar 100 nm) vesicles of 40–100 nm, corresponding to exosomes as well as a small MV in the centre. (B) Confocal microscopy analysis of CD61 allowed checking for the presence of platelet-derived MVs, which are the most abundant in the blood (63 $\times$  oil immersion objective, 1.4 zoom). Scale bar 1  $\mu$ m). (C) Flow cytometry analysis was performed after defining a gate for EVs using Megamix beads. EVs expressing CD61 (platelet-derived) and CD61<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> (endothelial-derived) were detected in the isolated fraction.

while the mRNA of another 4 (MAGUK p55 subfamily member 4, MPP4; ORM1-like protein 2, ORML2; CHD7; and XK-related protein 3) was shown to be carried by these vesicles (Supplementary Table S3). Two proteins have never been associated with EVs before (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, CYLD; and biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1). Thus, we provide new evidence of the expression of 6 proteins in EVs. Results from all quantified proteins in EVs are shown in Supplementary Table S4.

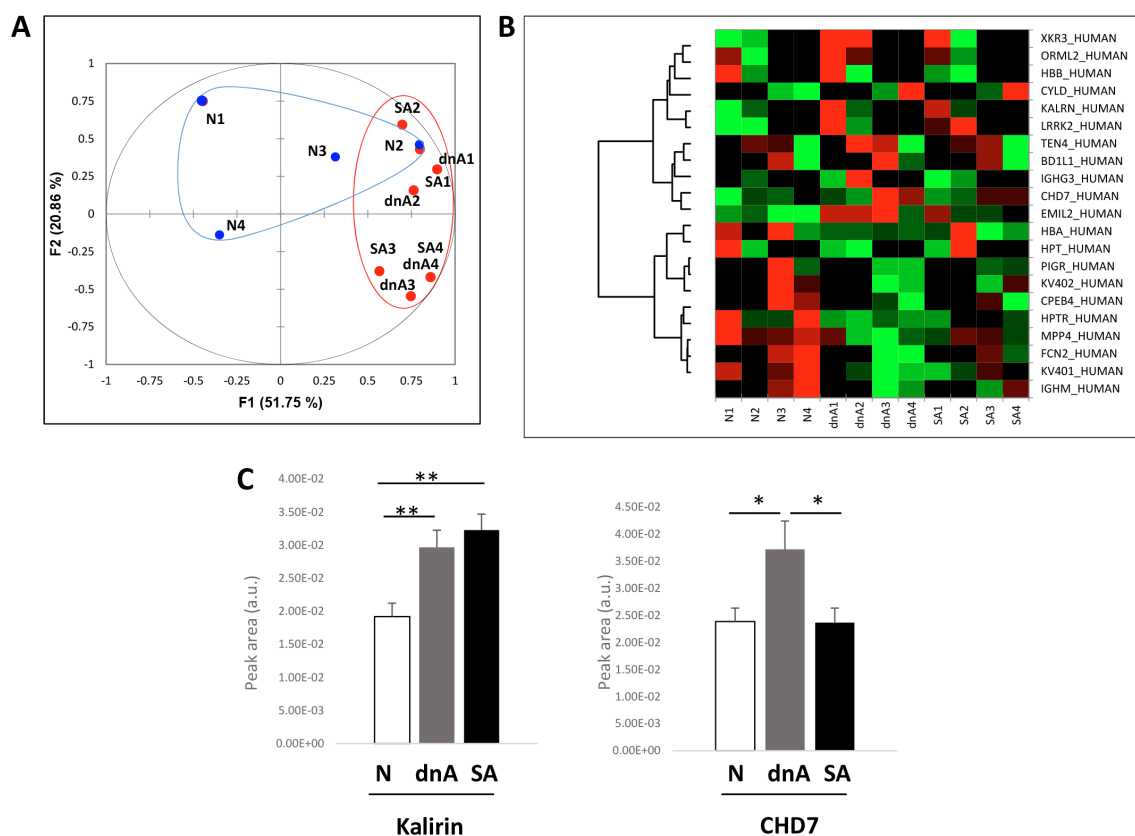
### Confirmation by SRM of the increased abundance of kalirin and CHD7 in EVs from hypertensive patients with albuminuria and analysis of correlation with E-selectin

Kalirin and CHD7 were analysed by SRM together with the cellular marker of activated ECs, E-selectin (CD62E). Quantification of these proteins was performed in an independent cohort of 99 patients: 49 albuminuric

(25 dnA, 24 SA) and 50 normoalbuminuric. Both kalirin and CHD7 were found to significantly increase in dnA (Figure 2C and Table 2). The former was increased in SA in a similar way, while levels of CHD7 in SA were similar to those of normoalbuminuric patients. A significant positive correlation of both proteins with CD62E was found in EVs (Table 2).

### *In vitro* analysis of the expression of kalirin and CHD7 in TNF- $\alpha$ treated ECFCs

In order to test the hypothesis that kalirin and CHD7 would increase in blood vessel ECs upon activation, ECs were isolated from human saphenous vein. These primary cultures provided us with an *in vitro* model of adult blood vessel ECs, which might be more reliable than commonly used human umbilical vein ECs (HUVECs). Expression of CD62E and CD106 was substantially increased in TNF- $\alpha$  treated cells compared to untreated controls as shown by flow cytometry (Figure 3A). Flow cytometric analysis



**Figure 2: EVs from hypertensive patients with albuminuria exhibit increased levels of kalirin and CHD7.** (A) differential analysis of EVs within N, dnA, and SA groups was performed by iTRAQ and LC-MS/MS. Proteins with log<sub>2</sub> of Fold-change (Zq) values  $\pm$  1.5 (Fold-change = 3) were considered differentially expressed. A. PCA was performed using these differential proteins. The first principal component greatly separates normoalbuminuric patients from the albuminuric patients, showing the EVs from normoalbuminuric patients express very different levels of proteins to those of the albuminuric. (B) Heatmap showing relative quantifications of the significant proteins. (C) Quantification of kalirin and CHD7 was performed by SRM in an independent cohort of 99 patients: 49 albuminuric (25 dnA, 24 SA) and 50 normoalbuminuric. The increase observed in albuminuric patients in the discovery phase was confirmed for the 3 proteins. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

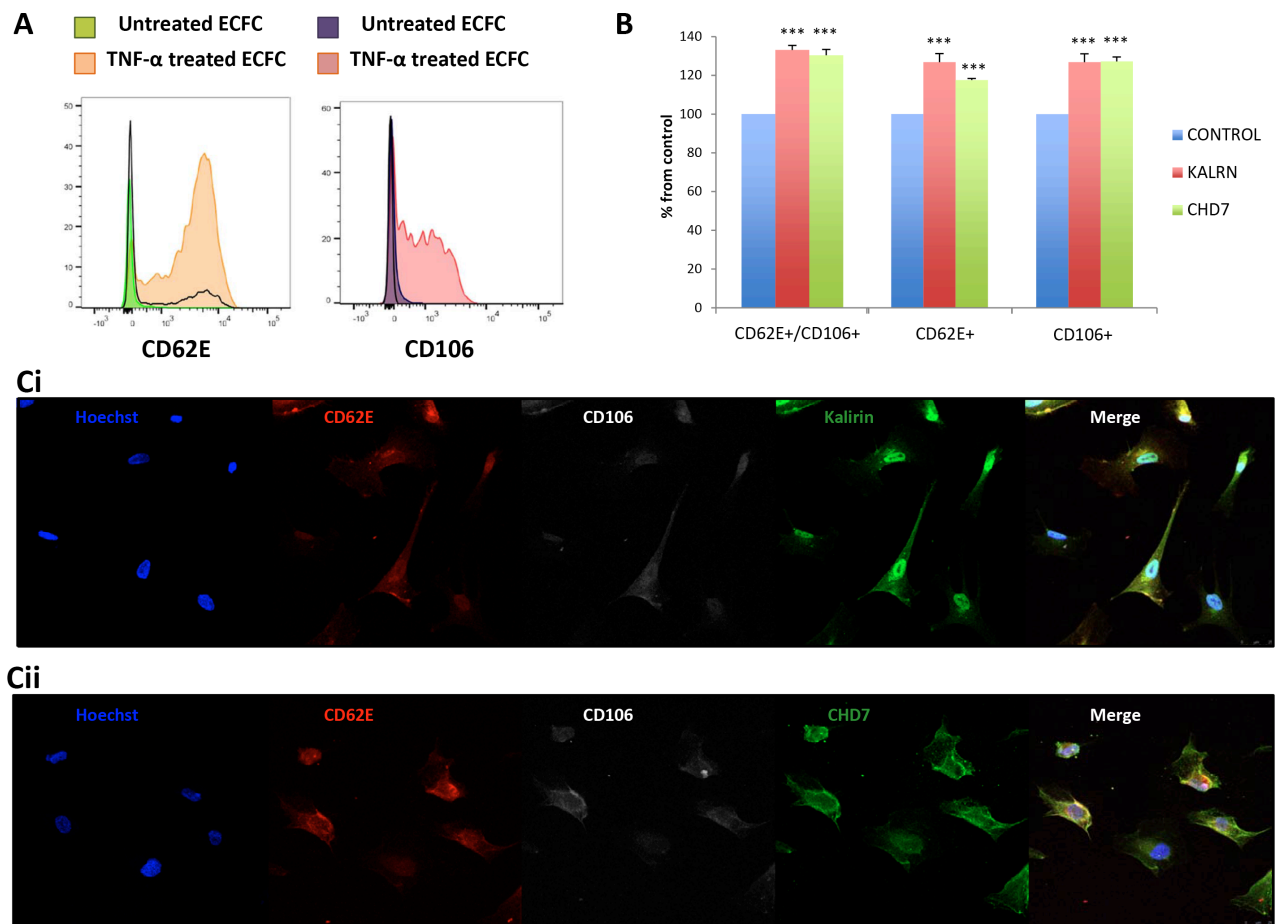


**Table 2: Results from the SRM confirmation analysis**

Protein	Alter.	ANOVA	Ratio dNA	N	Tukey	Ratio SA	N	Tukey	Ratio SA	dnA	Tukey	CD62E Correl.
Kalirin	↑dnA_N ↑SA_N	0.0007	1.55	0.0064	1.68	0.0014	1.09	NS				$p = 5.96E^{-11}$ $R^2 = 0.59$
CHD7	↑dnA_N ↓SA_N	0.0193	1.56	0.0282	0.99	NS	0.64	0.0495				$p = 3.02E^{-08}$ $R^2 = 0.52$
ORM1-like protein 2	↑SA_dnA	0.0019	0.64	NS	1.30	NS	2.04	0.0014				

of kalirin and CHD7 in TNF- $\alpha$  treated cells showed a significant increase in the expression of both proteins ( $p < 0.001$ ) in all activated cells (CD62E<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup> and CD62E<sup>+</sup>/CD106<sup>+</sup>) as compared to the double negatives (CD62E<sup>-</sup>/CD106<sup>-</sup>) (Figure 3B). Immunocytofluorescence

analysis of kalirin and CHD7, together with both activation markers showed similar results to those observed by flow cytometry and proved expression of the two proteins in ECs (Figure 3C) as well as in EVs budding from TNF- $\alpha$  activated cells (Figure 4 A and 4B).



**Figure 3: Kalirin and CHD7 are increased in endothelial cells upon activation.** Cells were treated with TNF- $\alpha$  or ECFC-medium alone for 5 h. (A, B) After activation, cells were trypsinized and labelled 1 h with the surface antibodies CD62E-APC and CD106-PE. After this, cells were fixed using 4% paraformaldehyde and permeabilized before incubating 90 min at 4°C with primary antibodies for the intracellular proteins kalirin and CHD7. All samples were analysed in a FACS CANTO II (BD Biosciences). A, Flow cytometry of TNF- $\alpha$  shows increased expression of the activation markers CD62E and CD106. B, Analysis of TNF- $\alpha$  activated cells by flow cytometry proved a significant increase of both kalirin and CHD7 in cells expressing CD62E and/or CD106. Control cells for this experiment were CD62<sup>-</sup>/CD106<sup>-</sup>. (C) Cells were fixed using 4% paraformaldehyde, permeabilized and labelled with CD62E-APC and CD106-PE as well as with either of the primary antibodies for kalirin or CHD7. After this, coverslips were incubated with a donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa-488 and Hoechst dye. Cells were visualized in a TCS SP5 confocal microscope (Leica). Immunofluorescence analysis of TNF- $\alpha$  treated cells confirmed the increase of kalirin (C1) and CHD7 (C2) in cells expressing any or both of the activation markers. All experiments were performed with at least  $n = 3$ . Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. KALRN: kalirin, E-selectin = CD62E, VCAM-1 = CD106.

## DISCUSSION

The development of albuminuria during RAS suppression involves increased shear stress [11], which triggers endothelial activation and subsequent dysfunction [5]. Besides, an increase oxidative stress has been shown to occur in these patients [6]. Reactive oxygen species (ROS) decrease endothelial nitric oxide (NO) bioavailability [12], which also results in endothelial dysfunction. On the other hand, endothelial activation occurring in the kidney from hypertensive patients leads to endothelial damage which reduces albumin filtration and provokes albuminuria [13]. For all these reasons, new indicators of albuminuria progression are needed to better characterize vascular condition of hypertensive patients. In this sense, analysis of proteins carried by circulating EVs seems a very interesting approach, since shear stress enhances release of EEVs [14] resulting in increased levels in the bloodstream of albuminuric patients [10].

Using a proteomics approach, we found 2 proteins, kalirin and CHD7, increased in patients developing dnA, which therefore may be indicators of the appearance of albuminuria in hypertensive patients under RAS blockage. Besides, a positive correlation of kalirin and CHD7 with the endothelial activation marker CD62E was also found. This result suggested these 2 proteins may be released by endothelial cells upon activation via EVs. We could confirm a significant increase in levels of kalirin and CHD7 in activated ECs *in vitro*. This proves an involvement of both proteins in endothelial cell activation within blood vessels and explains the observed increase in EVs from albuminuric patients, considering the inherent endothelial dysfunction associated. The results obtained *in vitro* showed a similar increase of CHD7 and kalirin upon EC activation, but a recovery in CHD7 up to normal levels was found in SA patients, which point to a different behaviour of both proteins. CHD7 seems to be an acute marker of endothelial dysfunction, which explains the increase in de novo albuminuria and the recovery in sustained albuminuria. On the other hand, Kalirin seems to be a more general indicator of endothelial damage as increases in both albuminuric groups. Kalirin, also called Duo, is involved in signal transduction. Its gene has been associated with susceptibility of coronary artery disease [15] and ischemic stroke [16]. Its expression by VSMCs has been associated with neointimal hyperplasia in mice [17]. Here we provide, for the first time, evidence of the expression of kalirin in human ECs and of its involvement in processes leading to endothelial dysfunction. Kalirin is known to inhibit iNOS [17, 18] and the hypothesis that it may also suppress NO availability in the endothelium by inhibiting eNOS is reasonable and deserves further research. Interestingly, NO release by ECs has been shown to decrease the release of EMVs [14] and therefore a potential inhibition of NO production triggered by kalirin is in accordance with both the observed augment

in activated ECs and circulating EVs from albuminuric patients.

There is not much information to date about protein CHD7 which functions as a transcriptional activator [19]. It is crucial during embryogenesis and has been involved in heart and great vessel development [19, 20]. Mutations in Chd7 gene are responsible for CHARGE syndrome, in which, heart and vascular system are impaired [21]. Therefore, CHD7 is deeply involved in cardiovascular system development and its correct function may be important for a good cardiovascular condition. In our work, increased expression of CHD7 by EVs has been linked to albuminuria and endothelial activation. Indeed, to date, there was no evidence of the expression of CHD7 by ECs, which we hereby have proved by both flow cytometry and immunofluorescence.

A limitation of our study might be the lack of sex matching among populations in the confirmation phase. We have anyway taken into consideration the existing differences in the correlation of albuminuria levels and disease state by adjusting albuminuria ranges according to gender, as a way of correcting this limitation. Further studies in greater cohorts will allow to assess potential of these biomarkers and evaluate influence of gender.

The hereby presented results support a potential involvement of kalirin and CHD7 proteins in human blood vessel endothelial dysfunction and show an increased expression of both by circulating EVs in albuminuric patients (Figure 4C). Hence, we propose levels of these proteins in circulating EVs as novel endothelial dysfunction markers to monitor vascular condition in hypertensive patients with albuminuria.

## MATERIALS AND METHODS

For more details of the experimental procedures, please see *Supplementary material*.

### Patients' recruitment

Patient selection and classification was previously described [1–4]. Briefly, 121 patients hypertensive patients with ( $n = 63$ ) or without albuminuria ( $n = 58$ ) were recruited between January 2012 and June 2013 after being followed for a minimum period of 3 years with visits to the Hypertension Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; at least, every 6 months. After that, the patients continued with their annual revisions. Patients were classified according to high albuminuria development during follow-up in 3 groups: (a) patients with persistent normoalbuminuria ( $N$ ,  $n = 58$ ); (b) patients developing de novo albuminuria during follow-up (dnA,  $n = 32$ ); (c) patients with sustained albuminuria during follow-up (SA,  $n = 31$ ). Characteristics and medications of the specific cohorts recruited for the discovery and confirmation phase are given in Table 1, respectively.

A human saphenous vein from revascularization surgery at Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain; was collected for isolation of the ECs addressed for primary cultures.

The study was conducted according to recommendations of Declaration of Helsinki and approved by the local Ethics Committee. Informed consent was requested from subjects prior to inclusion in the study.

### Extracellular vesicles (EVs) isolation

EVs were isolated as previously described [22], with minor modifications. For more details see *Supplementary material*.

### Electron microscopy (EM)

The precipitate of EVs obtained by ultracentrifugation was fixed in paraformaldehyde 4% and visualized after negative staining in a JEM 1010 (JEOL Peabody, MA, USA).

### iTRAQ labelling

To focus in the alterations occurring with albuminuria onset, two different groups attending to albuminuria development were independently analysed (dnA and SA,  $n = 14$ , 7 of each group). A nomoalbuminuric group ( $n = 8$ ) was used as control. In order to analyse four samples per

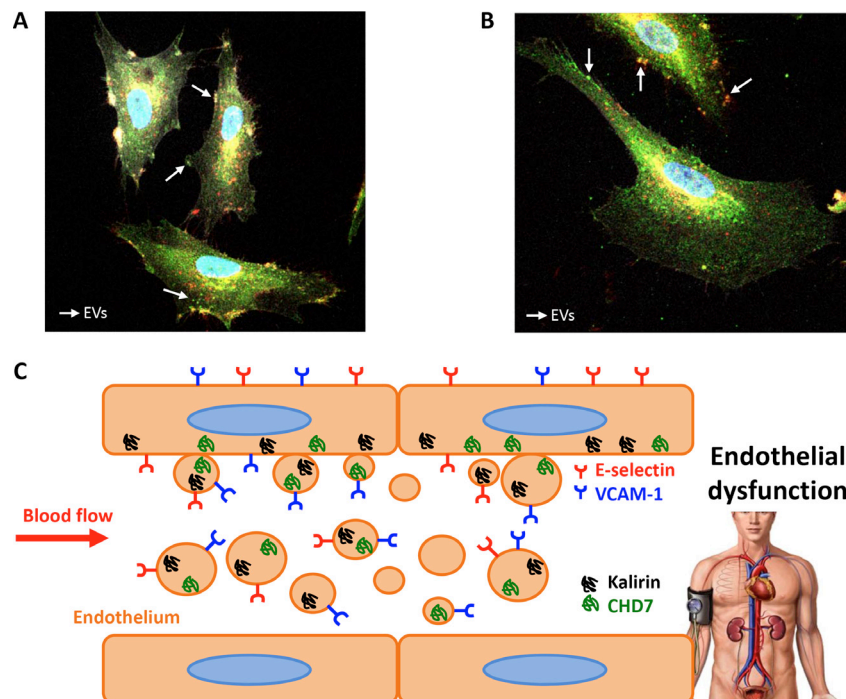
group, EVs from 2 patients were pooled when necessary. Two different 8-plex experiments were performed to process all the analysed sample pools. In every experiment two reference samples, each composed of a pool of 4 samples obtained from healthy blood donors, were labelled with the tags 113 and 117, in order to normalize quantifications and secure accurate comparison of samples between experiments. The tags addressed to label every sample are available on Supplementary Table S2.

### LC-MS/MS and differential analysis

Labelled peptide samples were analysed by LC-MS/MS in a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Protein quantification from reporter ion intensities and statistical analysis were performed using QuiXoT software. All the significant proteins found in the differential analysis were searched against two EVs databases: Vesiclepedia and EVpedia in order to find previous evidence of their expression in EVs, both MVs and exosomes, at the protein or mRNA level.

### SRM confirmation

For confirmation, EVs from an independent cohort of 99 patients were analysed by SRM: 49 albuminuric (25 dnA, 24 SA) and 50 normoalbuminuric. SRM transitions (3 per peptide) were monitored during an



**Figure 4: EVs from endothelial cells express kalirin and CHD7.** Immunofluorescence analysis of kalirin and CHD7 (green), CD62E (red) and CD106 (white) of TNF- $\alpha$  activated cells showed proved the expression of kalirin (A) and CHD7 (B) proteins by EVs. (C) Schematic conclusion. Overexpression of Kalirin and CHD7 proteins by activated endothelial cells due to increased shear stress may result in the observed increase in circulating EVs of hypertensive patients with albuminuria.

**Table 1: Baseline characteristics and medications of the patients recruited for discovery and confirmation phase**

Discovery phase				
	<i>N</i> ( <i>n</i> = 8)	dnA ( <i>n</i> = 7)	SA ( <i>n</i> = 7)	<i>P</i> -value
Age (years)	62 ± 6	63 ± 11	62 ± 10	0.79
Sex (male), %	50	70	70	0.6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 4	32 ± 4	30 ± 5	0.96
Current smoking, %	0	0	30	0.095
Total cholesterol (mg/dl)	194 ± 27	159 ± 16	182 ± 43	0.046
Triglycerides (mg/dl)	86 ± 22	97 ± 30	134 ± 77	0.13
HDL cholesterol (mg/dl)	56 ± 14	48 ± 8	47 ± 11	0.19
LDL cholesterol (mg/dl)	121 ± 28	92 ± 15	108 ± 31	0.04
Glycaemic (mg/dl)	100 ± 15	101 ± 16	106 ± 31	0.54
Uric acid (mg/dl)	4.6 ± 1.1	6 ± 2	6 ± 2	0.18
Creatinine clearance rate (mg/ml)	88 ± 22	114 ± 50	84 ± 43	0.48
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	83 ± 13	68 ± 23	67 ± 28	0.29
Systolic blood pressure (mmHg)	126 ± 9	136 ± 24	124 ± 13	0.95
Diastolic blood pressure (mmHg)	75 ± 10	81 ± 4	75 ± 11	0.93
Medications				
Antihypertensives, %				
ACEi	12	12	0	0.58
ARB	88	88	100	0.58
Diuretic	88	57	72	0.74
Calcium channel blocker	75	63	15	0.13
Beta blocking agent	25	29	29	0.98
Alpha blocking agent	13	14	14	0.3
Other treatments, %				
Anticoagulant agent	0	29	29	0.24
Lipid lowering agents	88	72	57	0.41
Antidiabetic agent	0	14	0	0.32
Confirmation phase				
	<i>N</i> ( <i>n</i> = 50)	dnA ( <i>n</i> = 25)	SA ( <i>n</i> = 24)	<i>P</i> -value
Age (years)	65 ± 11	68 ± 8	64 ± 12	0.23
Sex (male), %	38	64	67	0.024
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 4	29 ± 5	30 ± 4	0.6
Current smoking, %	10	20	13	0.48
Total cholesterol (mg/dl)	186 ± 29	165 ± 26	174 ± 28	0.007
Triglycerides (mg/dl)	123 ± 51	140 ± 66	141 ± 71	0.38
HDL cholesterol (mg/dl)	54 ± 12	51 ± 13	47 ± 14	0.06
LDL cholesterol (mg/dl)	107 ± 28	86 ± 17	101 ± 21	0.002
Glycaemic (mg/dl)	120 ± 41	128 ± 26	118 ± 34	0.57
Uric acid (mg/dl)	5 ± 2	6 ± 2	7 ± 2	0.0003
Creatinine clearance rate (mg/ml)	99 ± 41	86 ± 46	75 ± 37	0.017
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	80 ± 17	70 ± 22	67 ± 27	0.086



Systolic blood pressure (mmHg)	138 ± 17	136 ± 17	142 ± 29	0.64
Diastolic blood pressure (mmHg)	81 ± 11	81 ± 11	84 ± 15	0.69
<b>Medications</b>				
<b>Antihypertensives, %</b>				
ACEi	14	16	20	0.80
ARB	86	84	80	0.80
Diuretic	46	60	67	0.2
Calcium channel blocker	64	60	75	0.51
Beta blocking agent	26	32	30	0.86
Alpha blocking agent	18	32	17	0.31
<b>Other treatments, %</b>				
Anticoagulant agent	40	48	25	0.24
Lipid lowering agents	74	76	84	0.67
Antidiabetic agent	28	46	28	0.36

Values are expressed as mean ± SD or percentages (%). *P*-value was calculated using one-way ANOVA. BMI: body mass index; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; eGFR: estimated glomerular filtration rate. N: normoalbuminuria; dnA: *de novo* albuminuria; SA: sustained albuminuria.

individual sample analysis (SRM peptides analysed and settings are shown in Supplementary Table S3).

### Isolation and TNF- $\alpha$ activation of ECs

ECs were isolated from human saphenous vein and grown as previously described [23]. Endothelial phenotype of ECs was checked by flow cytometry and confocal microscopy (Supplementary Figure S1). For stimulating ECs, cells were seeded at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, treated with 10 ng/ml tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or ECFC-medium alone for 5 h.

### Flow cytometry

EVs were analysed by flow cytometry using platelet marker CD61 (most abundant source of EVs in blood). EVs gate was defined using MegaMix SSC Plus beads (Biotect).

For analysing ECs, cells were trypsinized after stimulation and labelled with the surface antibodies for E-selectin: CD62E-APC; and VCAM-1: CD106-PE as well as with either of the intracellular proteins kalirin and CHD7; followed by a donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa-488.

All samples were analysed in a FACS CANTO II (BD Biosciences). Experiment was repeated 3 times.

### Confocal microscopy

For visualizing EVs staining of CD61 or its isotype control was assayed. For ECs analysis, cells were seeded in coverslips and treated with TNF- $\alpha$  or ECFC-medium alone. Detection of EC activation markers E-selectin and VCAM-1 was accomplished, together with either of the

intracellular staining of kalirin or CHD7 using the same antibodies employed for flow cytometry.

EVs and cells were visualized in a TCS SP5 confocal microscope (Leica). All experiments were performed with *n* = 3.

### Statistical analysis

Values for patients' characteristics are expressed as means ± standard deviation (SD) or percentages. One-way ANOVA was used to calculate statistically significant differences of the values between different groups. Post-hoc analysis of significant ANOVA results was performed by means of Tukey analysis. In iTRAQ results, we have considered differentially expressed those proteins with log2 of Fold-change (Zq) values ± 1.5 (Fold-change = 3). For *in vitro* analyses, Student's *T*-test was performed and each experiment was repeated 3 times.

All statistics were calculated using SPSS 15.0 software, except for PCA and heatmap, which were done with XLSTAT for Excel (Microsoft).

### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge Dr. AF. Parguñña and Dr. A. García for their suggestions in EVs' isolation. LM. Lopez-Almodovar for collecting the saphenous vein. We would like to thank the Proteomic, Microscopy and Flow Cytometry Facilities (Hospital Nacional de Paraplejicos, Toledo, Spain) for their support.

### CONFLICTS OF INTEREST

None.

## GRANT SUPPORT

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI070537, IF08/3667-1, PI11-02239, PI 14/0917, PI11/01401, PI11/02432, PI13/01873, PI13/01746, PI13/01581, PI14/01650, PI14/01841), PT13/0001/0013, PIE13/00051, PIE13/00045, CP09/00229, IDCSalud(3371/002), Fundación Mutua Madrileña, Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz and FONDOS FEDER (RD06/0014/1015, RD12/0042/0071). These results are lined up with the Spanish initiative on the Human Proteome Project.

## REFERENCES

- Cerezo C, Ruilope LM, Segura J, Garcia-Donaire JA, de la Cruz JJ, Banegas JR, Waeber B, Rabelink TJ, Messerli FH. Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system suppression. *J Hypertens*. 2012; 30:204–209.
- Baldan-Martin M, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Moreno-Luna R, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Segura J, Padial LR, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics. *Int J Cardiol*. 2015; 196:170–177.
- Baldan-Martin M, Mourino-Alvarez L, Gonzalez-Calero L, Moreno-Luna R, Sastre-Oliva T, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Ruilope LM, de la Cuesta F\*, et al. Plasma molecular signatures in hypertensive patients with renin-angiotensin system suppression: new predictors of renal damage and de novo albuminuria indicators. *Hypertension*. 68:157–66.
- Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Segura J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression. *Cardiovasc Diabetol*. 2016; 15:8.
- Ando J, Yamamoto K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2013; 99:260–268.
- Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguiz I, Del Carmen, González M, Arribas S, Cerezo C, Segura J, Praga M, Fernández-Alfonso MS, Ruilope LM. Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens*. 2014; 32:2082–2091.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013; 200:373–383.
- Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest*. 2016; 126:1152–62.
- Ando J, Yamamoto K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2013; 99:260–268.
- Huang PH, Huang SS, Chen YH, Lin CP, Chiang KH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Chen JW, Lin SJ. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J Hypertens*. 2010; 28:1655–1665.
- Brown AJ, Teng Z, Evans PC, Gillard JH, Samady H, Bennett MR. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Jan 29. doi: 10.1038/nrcardio. 2015; 203.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009; 73:411–418.
- Rabelink TJ, de Zeeuw D. The glycocalyx—linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol*. 2015; 11:667–76.
- Vion AC, Ramkhelawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, Tedgui A, Lehoux S, Boulanger CM. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res*. 2013; 112:1323–1333.
- Wang L, Hauser ER, Shah SH, Pericak-Vance MA, Haynes C, Crosslin D, Harris M, Nelson S, Hale AB, Granger CB, Haines JL, Jones CJ, Crossman D, et al. Peakwide mapping on chromosome 3q13 identifies the kalirin gene as a novel candidate gene for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*. 2007; 80:650–663.
- Krug TI, Manso H, Gouveia L, Sobral J, Xavier JM, Albergaria I, Gaspar G, Correia M, Viana-Baptista M, Simões RM, Pinto AN, Taipa R, Ferreira C et al. Kalirin: a novel genetic risk factor for ischemic stroke. *Hum Genet*. 2010; 127:513–523.
- Wu JH, Fanaroff AC, Sharma KC, Smith LS, Brian L, Eipper BA, Mains RE, Freedman NJ, Zhang L. Kalirin promotes neointimal hyperplasia by activating Rac in smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33:702–708.
- Kone BC, Kunciewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 285:F178–190.
- Payne S, Burney MJ, McCue K, Popal N, Davidson SM, Anderson RH, Scambler PJ. A critical role for the chromatin remodeller CHD7 in anterior mesoderm during cardiovascular development. *Dev Biol*. 2015; 405:82–95.
- Randall V, McCue K, Roberts C, Kyriakopoulou V, Beddow S, Barrett AN, Vitelli F, Prescott K, Shaw-Smith C, Devriendt K, Bosman E, Steffes G, Steel KP, et al. Great vessel development requires biallelic expression of Chd7 and Tbx1 in pharyngeal ectoderm in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119:3301–3310.

21. Bosman EA, Penn AC, Ambrose JC, Kettleborough R, Stemple DL, Steel KP. Multiple mutations in mouse Chd7 provide models for CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:3463–3476.
22. Vélez P, Parguiña AF, Ocaranza-Sánchez R, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Alonso-Ortiz S, de la Cuesta F, Guitián E, Moreu J, Barderas MG, González-Juanatey JR, García Á. Identification of a circulating microvesicle protein network involved in ST-elevation myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2014; 112:716–726.
23. Lin RZ, Moreno-Luna R, Li D, Jaminet SC, Greene AK, Melero-Martin JM. Human endothelial colony-forming cells serve as trophic mediators for mesenchymal stem cell engraftment via paracrine signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111:10137–10142.

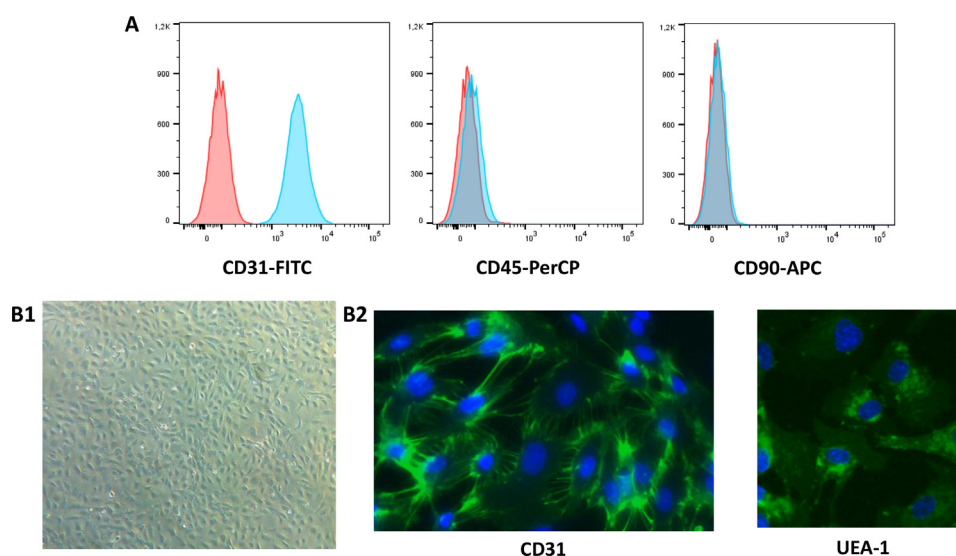
**AUTHOR QUERIES:**

Query	Remarks	
AQ1	Table 1 citation is found after Table 2. Please re-order.	
AQ2	Supplementary Table S1 Citation is Missing and Supplementary Figure S2 Citation is Missing in Ms. Please provide.	

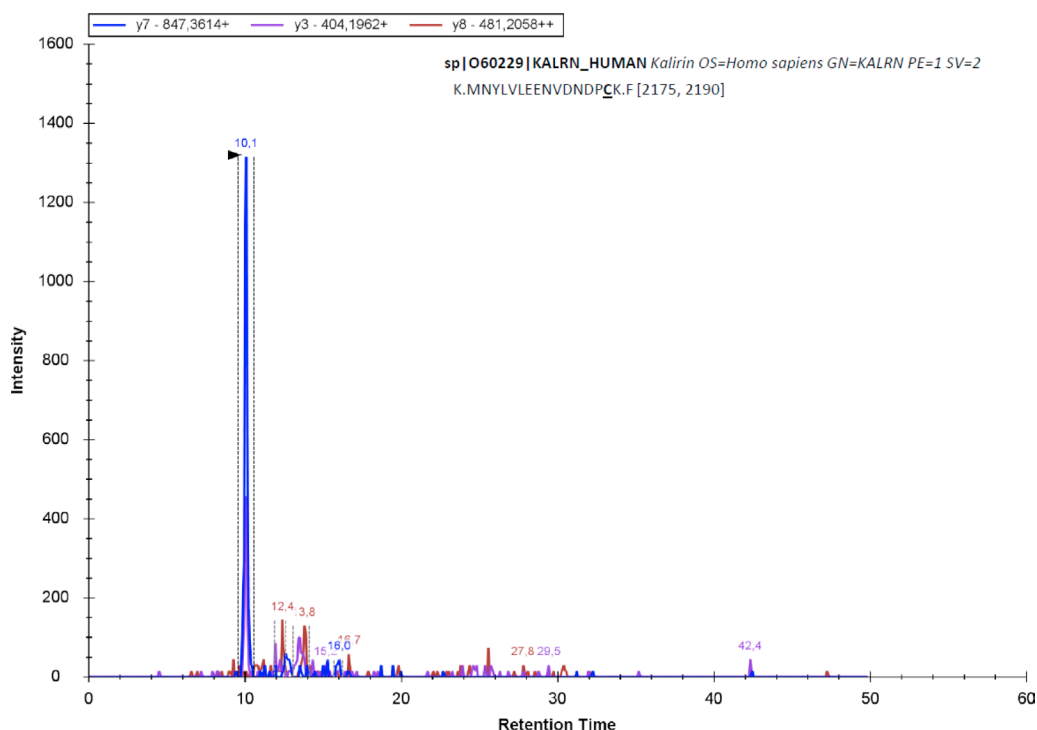


## Kalirin and CHD7: novel endothelial dysfunction indicators in circulating extracellular vesicles from hypertensive patients with albuminuria

### Supplementary Materials



**Supplementary Figure S1: Endothelial cell phenotype check of human saphenous vein ECs.** (A) Endothelial cells isolated from human saphenous vein were analysed by flow cytometry, and were found to be CD31<sup>+</sup> (endothelial marker), CD45<sup>-</sup> (hematopoietic marker) and CD90<sup>-</sup> (mesenchymal marker, used to rule out contamination of mesenchymal cells). (B1), Bright field image of ECs. (B2), Immunocytofluorescence analysis showing positivity for endothelial markers CD31 and lectin UEA-1.



**Supplementary Figure S2: Chromatograms from peptides and transitions used for SRM analysis.** SRM analysis was carried out in a TEMPO nano LC system coupled to a 4000 QTRAP modified triple quadrupole (AB Sciex). The 3 most intense transitions from each peptide were selected for the quantification.

**Supplementary Table S1: Experimental design used for iTRAQ analysis**

	113	114	115	116	117	118	119	121
<b>Experiment 1</b>	C1	N1	dnA1	SA1	C2	N2	dnA2	SA2
<b>Experiment 2</b>	C1	dnA3	SA3	N3	C2	dnA4	SA4	N4

Two different groups attending to albuminuria development were independently analysed (dnA and SA,  $n = 14$ , 7 of each group). A nomoalbuminuric group ( $n = 8$ ) was used as control. Two different 8-plex iTRAQ experiments were performed to analyze all samples and EVs from 2 patients were pooled when necessary. The 4 samples analyzed per group were labeled with a different tag to avoid labeling bias. A pool of 4 samples obtained from healthy blood donors, was labeled with the tags 113 and 117, in order to normalize quantifications and secure accurate comparison of samples between experiments.

## Supplementary Table S2: Peptides, transitions and settings used for SRM quantification

Protein Name	Protein reference Uniprot, gen name)	Peptide Sequence	Precursor	Product Mz	Transition	Decustering Potential	Collision Energy	Dwell time
Kalirin	sp O60229 KALRN_HUMAN	MNYLVLEENVNDNPCK	651,6291+++	847.361444	V - y7+	78.6	27.3	70
			651,6291+++	404.196216	P - y3+	78.6	27.3	70
			651,6291+++	481.205824	N - y8++	78.6	27.3	70
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	sp Q9P2D1 CHD7_HUMAN	WTDILSHGR	542,7803++	456.231356	S - y4+	70.7	26.7	60
			542,7803++	341.70338	I - y6++	70.7	26.7	60
			542,7803++	285.161348	L - y5++	70.7	26.7	60
E-selectin	sp P16581 LYAM2_HUMAN	DEDCVEIYIK	642,2948++	924.485916	C - y7+	77.9	32.3	60
			642,2948++	462.746596	C - y7++	77.9	32.3	60
			642,2948++	360.103755	D - b3+	77.9	32.3	60
		GYMNCLPSASGSFR	773,8425++	1081.509505	C - y10+	87.5	39.8	60
			773,8425++	356.174652	S - y7++	87.5	39.8	60
			773,8425++	352.132553	M - b3+	87.5	39.8	60

SRM analysis was carried out in a TEMPO nano LC system coupled to a 4000 QTRAP modified triple quadrupole (AB Sciex). All quantified peptides met a stringent criteria in which at least 6 transitions of the peptide were shown to co-elute in the chromatogram. Among these, the 3 most intense transitions were selected for the quantification. Besides, all peptides used for SRM quantification were searched against SRM Atlas database (<http://www.mrmatlas.org/index.php>). All had been previously used for SRM quantification of our proteins of interest and detected in similar conditions in a 4000 QTRAP mass spectrometer.

## Supplementary Table S3: Differential proteins found in the iTRAQ analysis of EVs

Gene	Protein	Alter.	Zq dNA_N	Zq SA_N	Zq SA_dnA	EVs DB
MPP4_HUMAN	MAGUK p55 subfamily member 4. MPP4	↓dnA ↓SA	-3.59	-1.64	1.94	MV; mRNA
HPT_HUMAN	Haptoglobin	↓dnA ↑SA	-2.17		2.79	MV. E; Protein
HPTR_HUMAN	Haptoglobin-related protein	↓dnA	-1.59			MV. E; Protein
KV402_HUMAN	Ig kappa chain V-IV region Len		-2.73	-1.88		MV; Protein
KV401_HUMAN	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	↓dnA ↓SA	-2.06			MV; Protein
CPEB4_HUMAN	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4	↓dnA ↓SA	-1.74	-1.75		MV; Protein
FCN2_HUMAN	Ficolin-2	↓dnA	-1.55			MV. E; Protein
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	↓SA		-2.88	-1.72	MV. E; Protein
IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C region	↓SA			-2.29	MV. E; Protein
LRRK2_HUMAN	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	↑dnA ↑SA	1.68	2.15		MV. E; Protein
KALRN_HUMAN	Kalirin	↑dnA	1.88			MV. E; Protein
ORML2_HUMAN	ORM1-like protein 2. ORML2	↑dnA	2			MV; mRNA
EMIL2_HUMAN	EMILIN-2	↑dnA	2.17			MV; Protein
CHD7_HUMAN	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7. CHD7	↑dnA ↓SA	2.62			MV. mRNA
CYLD_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. CYLD	↑dnA ↑SA	2.63	2.61		NO
BD1L1_HUMAN	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1	↓SA			-1.86	NO
PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	↓dnA ↓SA	-2.05	-1.6		MV. E; Protein
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	↓dnA	-1.91			MV. E; Protein
XKR3_HUMAN	XK-related protein 3	↑dnA	1.57			MV; mRNA
TEN4_HUMAN	Teneurin-4	↑dnA ↓SA	2.8		-1.63	MV. E; Protein

Alter: alteration. EVs DB: previous evidence of expression and molecular level (protein or mRNA) in EVs according to EVpedia and Vesiclepedia databases. MV: microvesicles. E: exosomes.

## Supplementary Table S4: Results iTRAQ LC-MS/MS. See Supplementary\_Table\_S4

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Extracellular vesicles (EVs) isolation

An amount of 14 ml of blood was collected from each patient using sodium citrate tubes. Platelet-free plasma (PFP) was obtained by 2 centrifugations: 1500·g, 25 min and 15,000·g, 2 min. Then, isolation of EVs by ultracentrifugation. A series of 3 ultracentrifugation steps were carried out at 250,000·g in a SW41 rotor of an Optima L-100 XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter): 1) HEPES 5 h 2) KBr 250 mM 15 h and 3) PBS 4 h; with the goal in mind of isolating EVs without contamination of the proteins from blood plasma. All of these were performed with the addition of 10 mM sodium citrate to prevent aggregation of EVs.

### Electron microscopy (EM)

The precipitate of EVs obtained by ultracentrifugation was suspended in 1 ml paraformaldehyde 4% in PBS. A 15 µl droplet of sample was placed in an electron microscopy Formvar/carbon grid (Ted Pella) for 10 min. After 5 min in bidistilled water, a negative staining was carried out using 20 µl of uranyl acetate 2%, 30 sec. The sample was visualized in a JEM 1010 (JEOL Peabody, MA, USA).

### iTRAQ labelling

To focus in the alterations occurring with albuminuria onset, two different groups attending to albuminuria development were independently analysed (dnA and SA,  $n = 14$ , 7 of each group). A normoalbuminuric group ( $n = 8$ ) was used as control. Isolated EVs from ultracentrifugation were lysed using 500 µl of lysis buffer (urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 4%, SDS 1%, DTT 1%) and two 2 min sonication steps. After centrifugation at 15,000·g, 5 min, supernatant was collected and quantified using the Bradford-Lowry method. In order to analyse four samples per group, EVs from 2 patients were pooled when necessary. For each analysed sample, a 150 µg aliquot was precipitated with cold acetone and suspended in Tris 50 mM, SDS 4%, DTT 50 mM adjusted to pH 8 and then loaded into PAGE-SDS gels to concentrate all the proteins in a single band. Proteins were in-gel digested overnight at 37°C with 60 ng/ml modified trypsin (Promega) at 12:1 protein:trypsin (w/w) ratio in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 8.8 containing 10% acetonitrile. For stable isobaric labelling, the resulting tryptic peptides were dissolved in triethylammonium bicarbonate (TEAB) buffer and labelled using two 8-plex iTRAQ Reagents Multiplex Kits (AB Sciex) according to manufacturer's protocol. Samples were labelled with iTRAQ reagents at room temperature (RT) for 1 h previously reconstituted with 70 µl of isopropanol. Reaction was stopped after incubation at RT for 2 h with 0.5% trifluoroacetic acid (TFA) and peptides were combined. Two different 8-plex experiments were performed to process all the analysed

sample pools. In every experiment two reference samples, each composed of a pool of 4 samples obtained from healthy blood donors, were labelled with the tags 113 and 117, in order to normalize quantifications and secure accurate comparison of samples between experiments. The tags addressed to label every sample are available on Supplementary Table S1.

### LC-MS/MS and differential analysis

Labelled peptide samples were analysed by LC-MS/MS using a C-18 reversed phase nano-column (75 µm I.D × 50 cm, 2 µm particle size, Acclaim PepMap RSLC, 100 C18 (Thermo Fisher Scientific) in a continuous acetonitrile gradient consisting of 0–30% B in 360 min, 50–90% A in 3 min (A = 0.5% formic acid; B = 90% acetonitrile, 0.5% formic acid). A flow rate of 200 nL/min was used to elute peptides from the reverse phase nano-column to an emitter nanospray needle for real time ionization and peptide fragmentation in a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). For increasing proteome coverage, iTRAQ-labelled samples were also fractionated by cation exchange chromatography (Oasis HLB-MCX columns) into six fractions, which were desalted and analysed by using the same system and conditions described before.

Spectra analysis for peptide identification was performed with the program Proteome Discoverer version 1.4.0.29 using SEQUEST-HT (Thermo Fisher Scientific). Only peptides with a confidence of at least 95% were used to quantify the relative abundance of each peptide determined. Protein quantification from reporter ion intensities and statistical analysis were performed using QuiXoT software. In this model protein log<sub>2</sub>-ratios are expressed in form of the standardized variables, i.e., in units of standard deviation according to their estimated variances (Zq values). Cut-off for significance was set at  $Zq = \pm 1.5$ . All the significant proteins found in the differential analysis were searched against two EVs databases: Vesiclepedia and EVpedia in order to find previous evidence of their expression in EVs, both MVs and exosomes, at the protein or mRNA level.

### SRM confirmation

For confirmation, an independent cohort of 99 patients was recruited: 49 albuminuric (25 dnA, 24 SA) and 50 normoalbuminuric. Samples were mixed according to their albuminuric levels in 34 pools prior to analysis. Protein samples were reduced with DTT 100 mM (Sigma Aldrich) and alkylated with iodoacetamide 550 mM (Sigma Aldrich), both in ammonium bicarbonate 50 mM (99% purity; Scharlau). The proteins were digested in ammonium bicarbonate 50 mM, acetonitrile 15% (LC-MS grade, Scharlau) with sequencing grade modified porcine trypsin (Promega) at a final concentration of 1:50. After digestion at 37°C overnight, 2% formic acid (99.5% purity; Sigma Aldrich) was added and samples were

cleaned with Pep-Clean spin columns (Pierce), according to manufacturer's instructions. Tryptic digests were dried in speed-vac and resuspended in 2% acetonitrile, 2% formic acid prior to MS analysis. The LC-MS/MS system consisted of a TEMPO nano LC system coupled to a 4000 QTRAP modified triple quadrupole (AB Sciex). Three replicate injections (4  $\mu$ L containing 20  $\mu$ g of protein) were performed per sample. RPLC was achieved on a C18 column (Onyx Monolithic C18, 150  $\times$  0.1mm I.D., Phenomenex). SRM transitions (3 per peptide) were monitored during an individual sample analysis (SRM peptides analysed and settings are shown in Supplementary Table S2). IntelliQuan algorithm included in Analyst 1.4.5 software was used to calculate abundances on the basis of peak areas after integration and normalization with the total ion chromatogram (TIC). All quantified peptides met a stringent criteria in which at least 6 transitions of the peptide were shown to co-elute in the chromatogram, therefore securing unambiguous assignment of the selected peptides to the corresponding protein. Among these, the 3 most intense transitions were selected for the quantification (Supplementary Table S2). Besides, all peptides used for SRM quantification were searched against SRM Atlas database (<http://www.mrmAtlas.org/index.php>). All had been previously used for SRM quantification of our proteins of interest and detected in similar conditions in a 4000 QTRAP mass spectrometer.

## Isolation of ECs

After clamping the branches from the human saphenous vein, it was washed with PBS and infused with trypsin-EDTA 0.1% for 5 min. Then, the vessel was perfused with D10 medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, 10% fetal bovine serum, FBS, 1  $\times$  L-Glutamine–Penicillin–Streptomycin, GPS) and the media collected, centrifuged at 300 g and the pelleted cells suspended in EC-medium (Endothelial Cell Growth Medium-2, EGM-2, except for hydrocortisone; Lonza, 20% FBS, 1x GPS). ECFC were grown and obtained as previously described<sup>1</sup>. Endothelial lineage of ECs was checked by flow cytometry by analysing positive expression of CD31 (FITC labelled, BD Biosciences) and negative expression of CD45 (PerCP labelled, BD Biosciences) and CD90 (APC labelled, BD Biosciences) (Suppl figure 1). By means of confocal microscopy endothelial phenotype was further proved showing CD31 expression as well as binding of *Ulex europaeus* agglutinin I lectin (UEA-1; Vector Laboratories) (Supplementary Figure S1).

## Flow cytometry

A 100  $\mu$ L aliquot of the EVs was analysed by flow cytometry with an antibody against CD61 or its isotype

control, both coupled to FITC (BD Biosciences). EVs gate was defined using MegaMix SSC Plus beads (Biocytex).

For analysing ECFCs, cells were seeded at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, treated with 10 ng/ml tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or ECFC-medium alone for 5 h, trypsinized and labelled 1 h with the surface antibodies for E-selectin: CD62E-APC; and VCAM-1: CD106-PE (BD Biosciences). After this, cells were fixed using 1% formaldehyde and permeabilized with 0.1 % triton X-100 in PBS before incubating 90 min at 4°C with either of the primary antibodies for the intracellular proteins kalirin (Santa Cruz) and CHD7 (Abcam). Then, they were incubated with a donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa-488 (Thermo Fisher Scientific), 90 min at 4°C.

All samples were analysed in a FACS CANTO II (BD Biosciences). All experiments were performed with at least  $n = 3$ .

## Confocal microscopy

For visualizing EVs, two aliquots of 50  $\mu$ L from the isolated EVs were suspended in 4% formaldehyde and placed in 2 coverslips and air dried. Then, they were blocked 1 h with 5% BSA and incubated 16 h with the same antibodies used for flow cytometry. Coverslips were mounted using Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich).

For ECFCs analysis, cells were seeded at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in coverslips and treated with TNF- $\alpha$  or ECFC-medium alone for 5 h. Then, cells were fixed using 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1 % triton X-100 in PBS and incubated 16 h at 4°C with CD62E-APC and CD106-PE, as well as with either of the primary antibodies for kalirin or CHD7. After this, coverslips were incubated with a donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa-488 and Hoechst dye.

EVs and cells were visualized in a TCS SP5 confocal microscope (Leica). All experiments were performed with at least  $n = 3$ .

## REFERENCES

- 1 Lin RZ, Moreno-Luna R, Li D, Jaminet SC, Greene AK, Melero-Martin JM. Human endothelial colony-forming cells serve as trophic mediators for mesenchymal stem cell engraftment via paracrine signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:10137–10142.

# Bibliografía



- 
- <sup>1</sup> Fuster V, Voute J. MDGs: chronic diseases are not on the agenda. *Lancet*. 2005;366:1512-4.
- <sup>2</sup> Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al, and the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127:e6–245.
- <sup>3</sup> The European health report 2012: charting the way to well-being. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe, 2012.
- <sup>4</sup> D'Agostino RB Sr., Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, Kannel WB. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117:743–753.
- <sup>5</sup> Woodward M, Brindle P, Tunstall-Pedoe H. Adding social deprivation and family history to cardiovascular risk assessment: the ASSIGN score from the Scottish Heart Health Extended Cohort (SHHEC). *Heart*. 2007;93:172–176. 45.
- <sup>6</sup> Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njolstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24:987–1003.
- <sup>7</sup> Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002;105:310–315.
- <sup>8</sup> Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y, Robson J, Minhas R, Sheikh A, Brindle P. Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2. *BMJ*. 2008;336:1475–1482.
- <sup>9</sup> Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. *JAMA*. 2007;297:611–619.
- <sup>10</sup> Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Fitzgerald A, Conroy R, Sans S. How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009. Jun;16(3):304-14.
- <sup>11</sup> Kesteloot H, Sans S, Kromhout D. Dynamics of cardiovascular and all-causes mortality in Western and Eastern Europe between 1970-2000. *Eur Heart J*. 2006 Jan;27(1):107-13.
- <sup>12</sup> M. Volpe, A. Battistoni, G. Tocci, E. A. Rosei, A. L. Catapano, R. Coppo, S. del Prato, S. Gentile, E. Mannarino, S. Novo, D. Prisco, and G. Mancia, “Cardiovascular risk assessment beyond Systemic Coronary Risk Estimation: a role for organ damage markers,” *J Hypertens*. 2012 vol. 30, no. 6, pp. 1056–1064.
- <sup>13</sup> T. Sehestedt, J. Jeppesen, T. W. Hansen, K. Wachtell, H. Ibsen, C. Torp-Petersen, P. Hildebrandt, and M. H. Olsen, “Risk prediction is improved by adding markers of subclinical organ damage to SCORE,” *Eur. Heart J*. 2010, vol. 31, no. 7, pp. 883–891.



- 
- <sup>14</sup> European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens.* 2003;21:1011–1053.
- <sup>15</sup> Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2007;25:1105–1187.
- <sup>16</sup> Guidelines Subcommittee 1999 World Health Organization International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens.* 1999;17:151–183.
- <sup>17</sup> World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. World Health Organization (WHO)/ International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens.* 2003;21:1983–1992.
- <sup>18</sup> WHO. A global brief on hypertension. Geneva: World Health Organization, 2013.
- <sup>19</sup> Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet.* 2002;360:1903–1913. 4.
- <sup>20</sup> Britton KA, Gaziano JM, Djousse L. Normal systolic blood pressure and risk of heart failure in US male physicians. *Eur J Heart Fail.* 2009;11:1129–1134.
- <sup>21</sup> Kalaitzidis RG, Bakris GL. Prehypertension: is it relevant for nephrologists? *Kidney Int.* 2010;77:194–200.
- <sup>22</sup> Dzau V, Braunwald E. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement. *Am Heart J.* 1991 Apr;121(4 Pt 1):1244–63. Review.
- <sup>23</sup> Dzau VJ, Antman EM, Black HR, Hayes DL, Manson JE, Plutzky J, Popma JJ, Stevenson W. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part II: Clinical trial evidence (acute coronary syndromes through renal disease) and future directions. *Circulation.* 2006;114:2871–91. Review.
- <sup>24</sup> Gustafsson F, Segura J, Ruilope LM. How should we manage heart failure developing in patients already treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta blockers for hypertension, diabetes or coronary disease? *J Hypertens.* 2010; 28: 1595–1598.
- <sup>25</sup> ACCORD Study Group, Cushman WC, Evans GW, Byington RP, Goff DC Jr, Grimm RH Jr, Cutler JA, Simons-Morton DG, Basile JN, Corson MA, Probstfield JL, Katz L, Peterson KA, Friedewald WT, Buse JB, Bigger JT, Gerstein HC, Ismail-Beigi F. Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2010;362:1575–85.
- <sup>26</sup> Mann JFE, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, et al.; ONTARGET investigators. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet.* 2008; 372:547–553.

- 
- <sup>27</sup> Schmieder RE, Mann JF, Schumacher H, Gao P, Mancia G, Weber MA, McQueen M, Koon T, Yusuf S; ONTARGET Investigators. Changes in albuminuria predict mortality and morbidity in patients with vascular disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1353-64.
- <sup>28</sup> Wachtell, K. et al. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive therapy and reduction in sudden cardiac death. *Circulation* 2007; 116: 700–705.
- <sup>29</sup> Verdecchia P, Sleight P, Mancia G, Fagard R, Trimarco B, Schmieder RE, Kim JH, Jennings G, Jansky P, Chen JH, Liu L, Gao P, Probstfield J, Teo K, Yusuf S; ONTARGET/TRANSCEND Investigators. Effects of telmisartan, ramipril, and their combination on left ventricular hypertrophy in individuals at high vascular risk in the Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global End Point Trial and the Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE Intolerant Subjects With Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2009;120:1380-9.
- <sup>30</sup> Wachtell K, Ibsen H, Olsen MH, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Okin PM, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Snapinn SM, Aurup P. Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. *Ann Intern Med*. 2003;139:901-6.
- <sup>31</sup> Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Wang X, Maggioni A, Budaj A, Chaithiraphan S, Dickstein K, Keltai M, Metsärinne K, Oto A, Parkhomenko A, Piegas LS, Svendsen TL, Teo KK, Yusuf S; ONTARGET investigators. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2008;372:547-53.
- <sup>32</sup> Ruilope LM. Current challenges in the clinical management of hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2011;9:267-75. Review.
- <sup>33</sup> Zanchetti A. Hypertension: Cardiac hypertrophy as a target of antihypertensive therapy. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:66-7.
- <sup>34</sup> G. Mancia, R. Fagard, K. Narkiewicz, J. Redon, A. Zanchetti, M. Böhm, T. Christiaens, R. Cifkova, G. De Backer, A. Dominiczak, M. Galderisi, D. E. Grobbee, T. Jaarsma, P. Kirchhof, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, A. J. Manolis, P. M. Nilsson, L. M. Ruilope, R. E. Schmieder, P. A. Sirnes, P. Sleight, M. Viigimaa, B. Waeber, and F. Zannad, “2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC),” *Eur. Heart J*. 2013;28:2159–2219.
- <sup>35</sup> Center for Disease Control, “High blood pressure Fact Sheet,” CDC, vol. 179, no. February, pp. 1–2, 2015.
- <sup>36</sup> De Simone, Verdecchia P, Pede S, Gorini M, Maggioni AP: Prognosis of inappropriate left ventricular mass in hypertension: the MAVI Study. *Hypertension*. 2002;40: 470-6.
- <sup>37</sup> Poulter NR, Prabhakaran D, Caulfield M. Hypertension. *Lancet*. 2015;386:801-12. Review.
- <sup>38</sup> Swales JD. Guidelines for treating hypertension: improved care or retarded progress? *Am J Hypertens*. 1994;7:873-6.

- 
- <sup>39</sup> Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press*. 2014;23:3-16.
- <sup>40</sup> Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360:1903–1913.
- <sup>41</sup> Thompson AM, Hu T, Eshelbrenner CL, Reynolds K, He J, Bazzano LA. Antihypertensive treatment and secondary prevention of cardiovascular disease events among persons without hypertension: a meta-analysis. *JAMA*. 2011;305:913-22.
- <sup>42</sup> Meerson FZ. Compensatory hyperfunction of the heart and cardiac insufficiency. *Circ Res*. 1962;10:250.
- <sup>43</sup> Sasayama S, Franklin D, Ross J Jr. Hyperfunction with normal inotropic state of the hypertrophied left ventricle. *Am J Physiol*. 1977;232:H418-25.
- <sup>44</sup> Crippa G. Microalbuminuria in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2002;16: S74-S7.
- <sup>45</sup> Dahlof B. Prevention of stroke in patients with hypertension. *Am J Cardiol*. 2007;100:17J–24J. Review.
- <sup>46</sup> Lammie GA. Hypertensive cerebral small vessel disease and stroke. *Brain Pathol*. 2002;12:358-70. Review.
- <sup>47</sup> Semlitsch T, Jeitler K, Berghold A, Horvath K, Posch N, Poggenburg S, Siebenhofer A. Long-term effects of weight-reducing diets in people with hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;3:CD008274. Review
- <sup>48</sup> Ruilope LM. Current challenges in the clinical management of hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2011;267-75. Review.
- <sup>49</sup> Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998;97:1411-1420.
- <sup>50</sup> Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karlberg B, Madsbad S, Jervell J, Mustonen J; Diabetics Exposed to Telmisartan and Enalapril Study Group. Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2004 4;351:1952-61.
- <sup>51</sup> S. Oparil and R. E. Schmieder, “New Approaches in the Treatment of Hypertension,” *Circ. Res.*, vol. 116, no. 6, pp. 1074–1095, 2015.
- <sup>52</sup> Raffe M: medical use of colloids, in bonagura jd (ed): kirk's current veterinary therapy: small animal practice xiii. philadelphia, wb saunders, 2000, 66-69.
- <sup>53</sup> Crippa G. Microalbuminuria in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2002;16:S74-7. Review.

- 
- <sup>54</sup> de Jong PE, Gansevoort RT, Bakker SJ. Macroalbuminuria and microalbuminuria: do both predict renal and cardiovascular events with similar strength? *J Nephrol.* 2007 Jul-Aug;20(4):375-80. Review. PubMed PMID: 17879201.
- <sup>55</sup> Bover J, Fernández-Llama P, Montañés R, Calero F. Albuminuria: beyond the kidney. *Med Clin.* 2008;130:20-3. Review.
- <sup>56</sup> Sehestedt T, Jeppesen J, Hansen TW, Wachtell K, Ibsen H, Torp-Pedersen C, Hildebrandt P, Olsen MH. Risk prediction is improved by adding markers of subclinical organ damage to SCORE. *Eur Heart J.* 2010;31:883-91.
- <sup>57</sup> Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al; Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2007;25:1105–1187.
- <sup>58</sup> American Diabetes Association. Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes—2010. *Diabetes Care.* 2010; 33: S4-S10.
- <sup>59</sup> Jalal S, Sofi FA, Alai MS, Bhat MA, Khan KA, Jan VM, Lone NA, Rather HA. Prevalence of microalbuminuria in essential hypertension: A study of patients with mild to moderate hypertension. *Indian J Nephrol.* 2001;11:6-11.
- <sup>60</sup> Hitha B, Pappachan JM, Pillai HB, Sujathan P, Ramakrishna CD, Jayaprakash K, Raihanathul Misiriya KJ. Microalbuminuria in patients with essential hypertension and its relationship to target organ damage: an Indian experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2008;19:411-9.
- <sup>61</sup> Gustafsson F, Segura J, Ruilope LM. How should we manage heart failure developing in patients already treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers for hypertension, diabetes or coronary disease? *J Hypertens.* 2010;28:1595-8. Review.
- <sup>62</sup> Haller H, Ito S, Izzo JL Jr, Januszewicz A, Katayama S, Menne J, Mimran A, Rabelink TJ, Ritz E, Ruilope LM, Rump LC, Viberti G; ROADMAP Trial Investigators. Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2011;364:907-17.
- <sup>63</sup> Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, Bruno S, Iliev IP, Brusegan V, Rubis N, Gherardi G, Arnoldi F, Ganeva M, Ene-Iordache B, Gaspari F, Perna A, Bossi A, Trevisan R, Dodesini AR, Remuzzi G; Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2004 Nov 4;351:1941-51.
- <sup>64</sup> International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431:931-45.
- <sup>65</sup> Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by twodimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y).* 1996;14:61–65.
- <sup>66</sup> Anderson NL, Anderson NG: Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis.* 1998;19:1853-1861.

- <sup>67</sup> Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405:837-46.
- <sup>68</sup> Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. 1999;17:121-7.
- <sup>69</sup> Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405:837-46.
- <sup>70</sup> Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422:193-7.
- <sup>71</sup> Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*. 2008;452:571-9.
- <sup>72</sup> Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405:837-846.
- <sup>73</sup> Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, Piubelli C, Cecconi D, Campostrini N, Zanusso G, Monaco S. The proteome: anno Domini 2002. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:425-438.
- <sup>74</sup> Stults JT, Arnott D. Proteomics. *Methods Enzymol*. 2005;402:245-289.
- <sup>75</sup> Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. 2005;382:66978.
- <sup>76</sup> Domon, B. & Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312:212-217.
- <sup>77</sup> Barallobre-Barreiro J, Chung YL, Mayr M. Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:657-61.
- <sup>78</sup> Thongboonkerd V, Gozal E, Sachleben LR Jr, Arthur JM, Pierce WM, Cai J, Chao J, Bader M, Pesquero JB, Gozal D, Klein JB. Proteomic analysis reveals alterations in the renal kallikrein pathway during hypoxia-induced hypertension. *J Biol Chem*. 2002;277:34708-16.
- <sup>79</sup> Jin X, Xia L, Wang LS, Shi JZ, Zheng Y, Chen WL, Zhang L, Liu ZG, Chen GQ, Fang NY. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Proteomics*. 2006;6:1948-56.
- <sup>80</sup> Delbosc S, Haloui M, Louedec L, Dupuis M, Cubizolles M, Podust VN, Fung ET, Michel JB, Meilhac O. Proteomic analysis permits the identification of new biomarkers of arterial wall remodeling in hypertension. *Mol Med*. 2008;14:383-94.
- <sup>81</sup> Pena MJ, Jankowski J, Heinze G, Kohl M, Heinzl A, Bakker SJ, Gansevoort RT, Rossing P, de Zeeuw D, Heerspink HJ, Jankowski V. Plasma proteomics classifiers improve risk prediction for renal disease in patients with hypertension or type 2 diabetes. *J Hypertens*. 2015;33:2123-32
- <sup>82</sup> Merchant ML, Niewczas MA, Ficociello LH, Lukenbill JA, Wilkey DW, Li M, Khundmiri SJ, Warram JH, Krolewski AS, Klein JB. Plasma kininogen and kininogen fragments are biomarkers of progressive renal decline in type 1 diabetes. *Kidney Int*. 2013;83:1177-84.
- <sup>83</sup> Al-Omari MA, Khaleghi M, Mosley TH Jr, Turner ST, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A, Kullo IJ. Mid-regional pro-adrenomedullin is associated with pulse pressure, left ventricular mass, and albuminuria in African Americans with hypertension. *Am J Hypertens*. 2009;22:860-6.

- 
- <sup>84</sup> Jin J, Ku YH, Kim Y, Kim Y, Kim K, Lee JY, Cho YM, Lee HK, Park KS, Kim Y. Differential proteome profiling using iTRAQ in microalbuminuric and normoalbuminuric type 2 diabetic patients. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:168602.
- <sup>85</sup> Schlatzer D, Maahs DM, Chance MR, Dazard JE, Li X, Hazlett F, Rewers M, Snell-Bergeon JK. Novel urinary protein biomarkers predicting the development of microalbuminuria and renal function decline in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35:549-55.
- <sup>86</sup> Matafora V, Zagato L, Ferrandi M, Molinari I, Zerbini G, Casamassima N, Lanzani C, Delli Carpini S, Trepiccione F, Manunta P, Bachi A, Capasso G. Quantitative proteomics reveals novel therapeutic and diagnostic markers in hypertension. *BBA Clin*. 2014;2:79-87.
- <sup>87</sup> Kern EF, Erhard P, Sun W, Genuth S, Weiss MF. Early urinary markers of diabetic kidney disease: a nested case-control study from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Am J Kidney Dis*. 2010;55:824-834.
- <sup>88</sup> Roscioni SS, de Zeeuw D, Hellemons ME, Mischak H, Zürbig P, Bakker SJ, Gansevoort RT, Reinhard H, Persson F, Lajer M, Rossing P, Lambers Heerspink HJ. A urinary peptide biomarker set predicts worsening of albuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2013;56:259-67.
- <sup>89</sup> Vivanco F, López-Bescós L, Tuñón J, Egido J. Proteómica y enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardiol*. 2003;56:289-302.
- <sup>90</sup> Wilson AM, Kimura E, Harada RK, Nair N, Narasimhan B, Meng XY, et al. Beta 2-microglobulin as a biomarker in peripheral arterial disease: proteomic profiling and clinical studies. *Circulation*. 2007;116:1396403.
- <sup>91</sup> Sans-Roselló J, Casals G, Rosselló X, de la Presa BG, Vila M, Duran-Cambra A, Morales-Ruiz M, Ferrero-Gregori A, Jiménez W, Sionis A. Prognostic Value of Plasma Apelin Concentrations at Admission in Patients with ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction. *Clin Biochem*. 2016;23. pii:S0009-9120(16)30252-1.
- <sup>92</sup> Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez JF, Estella-García Á, González-García MÁ. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. *Ann Transl Med*. 2016;4:329. Review.
- <sup>93</sup> Alvarez-Llamas G, Martín-Rojas T, de la Cuesta F, Calvo E, Gil-Dones F, Dardé VM, Lopez-Almodovar LF, Padial LR, Lopez JA, Vivanco F, Barderas MG. Modification of the secretion pattern of proteases, inflammatory mediators, and extracellular matrix proteins by human aortic valve is key in severe aortic stenosis. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12:2426-39.
- <sup>94</sup> Martín-Rojas T, Gil-Dones F, Lopez-Almodovar LF, Padial LR, Vivanco F, Barderas MG. Proteomic profile of human aortic stenosis: insights into the degenerative process. *J Proteome Res*. 2012;11:1537-50.
- <sup>95</sup> Laborde CM, Mourino-Alvarez L, Posada-Ayala M, Alvarez-Llamas G, Serranillos-Reus MG, Moreu J, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome. *Metabolomics*. 2014;10:414-424.
- <sup>96</sup> Laborde CM, Alonso-Orgaz S, Mourino-Alvarez L, Moreu J, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. The plasma proteomic signature as a strategic tool for early diagnosis of acute coronary syndrome. *Proteome Sci*. 2014;12:43.

- <sup>97</sup> Alonso-Organ S, Moreno-Luna R, López JA, Gil-Dones F, Padial LR, Moreu J, de la Cuesta F, Barderas MG. Proteomic characterization of human coronary thrombus in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J Proteomics*. 2014;109:368-81.
- <sup>98</sup> Vivanco F, Padial LR, Darde VM, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Diaz-Prieto N, Barderas MG. Proteomic Biomarkers of Atherosclerosis. *Biomark Insights*. 2008;3:101-113.
- <sup>99</sup> Baldan-Martin M, Mourino-Alvarez L, Gonzalez-Calero L, Moreno-Luna R, Sastre-Oliva T, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Ruilope LM, de la Cuesta F, Barderas MG. Plasma Molecular Signatures in Hypertensive Patients With Renin-Angiotensin System Suppression: New Predictors of Renal Damage and De Novo Albuminuria Indicators. *Hypertension*. 2016;68:157-66.
- <sup>100</sup> Baldan-Martin M, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Moreno-Luna R, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Segura J, Padial LR, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics. *Int J Cardiol*. 2015;196:170-7.
- <sup>101</sup> Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest*. 2016;126:1152-62.
- <sup>102</sup> Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res*. 2010;107:1047–57.
- <sup>103</sup> Waldenström A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One*. 2012;7:e34653.
- <sup>104</sup> Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012;1820:940–8.
- <sup>105</sup> Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, Li JP, Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2013;110:17380–5.
- <sup>106</sup> Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. 1998;4:594-600.
- <sup>107</sup> Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotypethrough MET. *Nat Med*. 2012;18:883-91.
- <sup>108</sup> Del Portillo HA, Chitnis CE. Talking to each other to initiate sexual differentiation. *Cell*. 2013;153:945–947.
- <sup>109</sup> Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:195–208.

- <sup>110</sup> Fleury A, Martinez MC, Le LayvS. Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Front. Immunol.* 2014;5:370.
  - <sup>111</sup> Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009;21:575–581.
  - <sup>112</sup> Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2013;11:24-35.
  - <sup>113</sup> Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, Griffin G, Guerin C, Ho JE, Shaw SY, Cohen KS, Vasan RS, Tedgui A, Boulanger CM, Wang TJ. Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J.* 2014;35:2972-2979.
  - <sup>114</sup> Diehl P, Nagy F, Sossong V, Helbing T, Beyersdorf F, Olschewski M, Bode C, Moser M. Increased levels of circulating microparticles in patients with severe aortic valve stenosis. *Thromb Haemost.* 2008;99: 711-719.
  - <sup>115</sup> Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2358-2368.
  - <sup>116</sup> Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Desprez D, Chabot F, Weitzenblum E, Freyssinet JM, Chaouat A, Toti F. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:536-543.
  - <sup>117</sup> Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension.* 2003;41:211-217.
  - <sup>118</sup> Huang PH, Huang SS, Chen YH, Lin CP, Chiang KH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Chen JW, Lin SJ. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J Hypertens.* 2010;28:1655-1665.
  - <sup>119</sup> Acevedo Fernández, J.J., Angeles Chimal, J.S., Rivera, H.M., Petricevich López, V.L., Nolasco Quintana, N.Y., Collí Magaña, D.Y. & Santa-Olalla Tapia, J. (2013). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 2982). Barcelona: OmniaScience.
- 29
- <sup>120</sup> Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol.* 2002 Feb-Mar;40(2-3):193-236. Review.
  - <sup>121</sup> Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev.* 1990;70:427-51. Review.
  - <sup>122</sup> Modur V, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 1996;271:13094-102.



- 
- <sup>123</sup> Slowik MR, De Luca LG, Fiers W, Pober JS. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am J Pathol.* 1993;143:1724-30.
- <sup>124</sup> Heller RA, Krönke M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol.* 1994;126:5-9. Review.
- <sup>125</sup> Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest.* 1993;68:499-508. Review.
- <sup>126</sup> McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem.* 1995;270:11025-8. Review.
- <sup>127</sup> Gimbrone MA. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995;75:678-708.
- <sup>128</sup> Zimmerman GA, Lorant DE, McIntyre TM, Prescott SM. Juxtacrine intercellular signaling: another way to do it. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:573-7. Review.
- <sup>129</sup> Cerezo C, Ruilope LM, Segura J, Garcia-Donaire JA, de la Cruz JJ, Banegas JR, Waeber B, Rabelink TJ, Messerli FH. Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system suppression. *J Hypertens.* 2012;30:204-9.
- <sup>130</sup> Dardé VM, Barderas MG, Vivanco F. Depletion of high-abundance proteins in plasma by immunoaffinity subtraction for two-dimensional difference gel electrophoresis analysis. *Methods Mol Biol.* 2007;357:351-64.
- <sup>131</sup> Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
- <sup>132</sup> Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
- <sup>133</sup> Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis.* 1985;6:103-12.
- <sup>134</sup> Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996;68:850-8.
- <sup>135</sup> Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999;20:3551-67.
- <sup>136</sup> Martínez-Bartolomé S, Navarro P, Martín-Maroto F, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Villar M, García-Ruiz JP, Vázquez J. Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7:1135-1145.
- <sup>137</sup> Navarro P, Vázquez J. A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *J Proteome Res.* 2009;8:1792-1796.

- <sup>138</sup> Bonzon-Kulichenko E, Garcia-Marques F, Trevisan-Herraz M, Vázquez J. Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: problems associated with the use of narrow mass precursor windows. *J Proteome Res.* 2015;14:700-710.
- <sup>139</sup> Bonzon-Kulichenko E, Pérez-Hernández D, Núñez E, Martínez-Acedo P, Navarro P, Trevisan-Herraz M, Ramos Mdel C, Sierra S, Martínez-Martínez S, Ruiz-Meana M, Miró-Casas E, García-Dorado D, Redondo JM, Burgos JS, Vázquez J. A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10: M110.003335.
- <sup>140</sup> Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, Núñez E, Martínez Acedo P, Pérez-Hernández D, Jorge I, Mesa R, Calvo E, Carrascal M, Hernáez ML, García F, Bárcena JA, Ashman K, Abian J, Gil C, Redondo JM, Vázquez J. General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling. *J Proteome Res.* 2014;13:1234-47.
- <sup>141</sup> Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44-57.
- <sup>142</sup> Mi H, Lazareva-Ulitsky B, Loo R, Kejariwal A, Vandergriff J, Rabkin S, Guo N, Muruganujan A, Doremieux O, Campbell MJ, Kitano H, Thomas PD. The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:D284-8.
- <sup>143</sup> Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, Bork P, von Mering C. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D412-6.
- <sup>144</sup> García-Marqués F, Trevisan-Herraz M, Martínez-Martínez S, Camafeita E, Jorge I, Lopez JA, Méndez-Barbero N, Méndez-Ferrer S, Del Pozo MA, Ibáñez B, Andrés V, Sánchez-Madrid F, Redondo JM, Bonzon-Kulichenko E, Vázquez J. A Novel Systems-Biology Algorithm for the Analysis of Coordinated Protein Responses Using Quantitative Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15:1740-60.
- <sup>145</sup> Baldan-Martin M, Mourino-Alvarez L, Gonzalez-Calero L, Moreno-Luna R, Sastre-Oliva T, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Lopez JA, Vazquez J, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Ruilope LM, de la Cuesta F, Barderas MG. Plasma Molecular Signatures in Hypertensive Patients With Renin-Angiotensin System Suppression: New Predictors of Renal Damage and De Novo Albuminuria Indicators. *Hypertension.* 2016;68:157-66.
- <sup>146</sup> Baldan-Martin M, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Gonzalez-Calero L, Ruiz-Hurtado G, Moreno-Luna R, Mourino-Alvarez L, Sastre-Oliva T, Segura J, Padial LR, Vivanco F, Ruilope LM, Barderas MG. Prediction of development and maintenance of high albuminuria during chronic renin-angiotensin suppression by plasma proteomics. *Int J Cardiol.* 2015;196:170-7.
- <sup>147</sup> De Miguel C, Rudemiller NP, Abais JM, Mattson DL. Inflammation and hypertension: new understandings and potential therapeutic targets. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17:507.
- <sup>148</sup> Kitzler TM, Papillon J, Guillemette J, Wing SS, Cybulsky AV. Complement modulates the function of the ubiquitin-proteasome system and endoplasmic reticulum-associated degradation in glomerular epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823:1007-1016.
- <sup>149</sup> Sacks S, Zhou W. New boundaries for complement in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:1865–1869.
- <sup>150</sup> Khosla N, Sarafidis PA, Bakris GL. Microalbuminuria. *Clin Lab Med.* 2006;26:635-53. Review.

- <sup>151</sup>Schmaderer C, Heemann, U. Blocking innate immunity to slow the progression of chronic kidney disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014;387:905-907.
- <sup>152</sup>Hutchison CA, Burmeister A, Harding SJ, Basnayake K, Church H, Jesky MD, White K, Green CE, Stringer SJ, Bassett P, Ferro CJ, Cockwell P. Serum polyclonal immunoglobulin free light chain levels predict mortality in people with chronic kidney disease. *Mayo Clin Proc.* 2014;89:615-622.
- <sup>153</sup>Leventhal JS, He JC, Ross MJ. Autophagy and immune response in kidneys. *Semin Nephrol.* 2014;34:53-61.
- <sup>154</sup>Mason JC, Libby P. Cardiovascular disease in patients with chronic inflammation: mechanisms underlying premature cardiovascular events in rheumatologic conditions. *Eur Heart J.* 2015;36:482-9c.
- <sup>155</sup>de la Cuesta F, Zubiri I, Maroto AS, Posada M, Padial LR, Vivanco F, Alvarez-Llamas G, Barderas MG. Deregulation of smooth muscle cell cytoskeleton within the human atherosclerotic coronary media layer. *J Proteomics.* 2013;82:155-65.
- <sup>156</sup>de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Maroto AS, Donado A, Zubiri I, Posada M, Padial LR, Pinto AG, Barderas MG, Vivanco F. A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10:M110.003517
- <sup>157</sup>Barderas MG, Tuñón J, Dardé VM, De la Cuesta F, Jiménez-Nácher JJ, Tarín N, López-Bescós L, Egido J, Vivanco F. Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics.* 2009;9:1982-93.
- <sup>158</sup>Gutteridge JM, Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J.* 1998;256:861-865.
- <sup>159</sup>Vinchi F, De Franceschi L, Ghigo A, Townes T, Cimino J, Silengo L, Hirsch E, Altruda, F, Tolosano E. Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation.* 2013;127:1317-1329.
- <sup>160</sup>Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguez I, Del Carmen González M, Arribas S, Cerezo C, Segura J, Praga M, Fernández-Alfonso MS, Ruilope LM. Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens.* 2014;32:2082-2091.
- <sup>161</sup>Ohse T, Inagi R, Tanaka T, Ota T, Miyata T, Kojima I, Ingelfinger JR, Ogawa S, Fujita, T, Nangaku M. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006;70:1447-1455.
- <sup>162</sup>Rabelink TJ, de Zeeuw D. The glycocalyx-linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11:667-76. Review.
- <sup>163</sup>Cybulsky AV. The intersecting roles of endoplasmic reticulum stress, ubiquitin-proteasome system, and autophagy in the pathogenesis of proteinuric kidney disease. *Kidney Int.* 2013;84:25-33.
- <sup>164</sup>Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Johnson RJ. The immunological basis of hypertension. *Am J Hypertens.* 2014;27:1327-37.

- 
- <sup>165</sup>Hutchison CA, Burmeister A, Harding SJ, Basnayake K, Church H, Jesky MD, White K, Green CE, Stringer SJ, Bassett P, Ferro CJ, Cockwell P. Serum polyclonal immunoglobulin free light chain levels predict mortality in people with chronic kidney disease. *Mayo Clin Proc.* 2014;89:615-622.
- <sup>166</sup>Tian N, Gu JW, Jordan S, Rose RA, Hughson MD, Manning RD. Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1018-H1025.
- <sup>167</sup>Bomfim GF, Echemm C, Martinsm CB, Costa TJ, Sartoretto SM, Dos Santos RA, Oliveira MA, Akamine EH, Fortes ZB, Tostes RC, Webb RC, Carvalho MH. Toll-like receptor 4 inhibition reduces vascular inflammation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2015;122:1-7.
- <sup>168</sup>Snyder S, Pendergraph B. Detection and evaluation of chronic kidney disease. *Am Fam Physician* 2005; 72: 1723-1732.
- <sup>169</sup>Sehestedt T, Jeppesen J, Hansen TW, Wachtell K, Ibsen H, Torp-Pedersen C, Hildebrandt P, Olsen MH. Risk prediction is improved by adding markers of subclinical organ damage to SCORE. *Eur Heart J.* 2010;31:883-91.
- <sup>170</sup>Dobryszczyka W. Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35:647-654.
- <sup>171</sup> Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem.* 1996;42:1589-1600.
- <sup>172</sup> Lim YK, Jenner A, Ali AB, et al. Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Kidney Int.* 2000;58:1033-1044.
- <sup>173</sup>Ngai HH, Sit WH, Jiang PP, Thongboonkerd V, Wan JM. Markedly increased urinary preprohaptoglobin and haptoglobin in passive Heymann nephritis: a differential proteomics approach. *J Proteome Res.* 2007; 6: 3313-3320.
- <sup>174</sup>Neale TJ, Ojha PP, Exner M, Poczewski H, Rüger B, Witztum JL, Davis P, Kerjaschki D. Proteinuria in passive Heymann nephritis is associated with lipid peroxidation and formation of adducts on type IV collagen. *J Clin Invest.* 1994;94:1577-84.
- <sup>175</sup>Nangaku M, Shankland SJ, Couser WG. Cellular response to injury in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:1195-1204.
- <sup>176</sup>Bhensdadia NM, Hunt KJ, Lopes-Virella MF et al. Urine haptoglobin levels predict early renal functional decline in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2013;83:1136-1143.
- <sup>177</sup>Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E. Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci.* 1995;56:1749-1758.
- <sup>178</sup>Fox PL, Mazumder B, Ehrenwald E, Mukhopadhyay CK. Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1735-1744.
- <sup>179</sup>Kennedy DJ, Fan Y, Wu Y, Pepoy M, Hazen SL, Tang WH. Plasma ceruloplasmin, a regulator of nitric oxide activity, and incident cardiovascular risk in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9:462-467.

- <sup>180</sup> Jung CH, Lee WJ, Yu JH, Hwang JY, Shin MS, Koh EH, Kim MS, Park JY. Elevated serum ceruloplasmin levels are associated with albuminuria in Korean men with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94:e3-7.
- <sup>181</sup> Jung CH, Lee WJ, Yu JH et al. Elevated serum ceruloplasmin levels are associated with albuminuria in Korean men with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94:S3-S7.
- <sup>182</sup> Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482:157-171.
- <sup>183</sup> Christiansen MS, Hommel E, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Orosomucoid in urine predicts cardiovascular and over-all mortality in patients with Type II diabetes. *Diabetologia.* 2002;45:115-20.
- <sup>184</sup> Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Segura J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G. Urinary alpha-1 antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:8.
- <sup>185</sup> van Veldhuisen DJ, Ruilope LM, Maisel AS, Damman K. Biomarkers of renal injury and function: diagnostic, prognostic and therapeutic implications in heart failure. *Eur Heart J.* 2016;37:2577-85. Review.
- <sup>186</sup> Brown AJ, Teng Z, Evans PC, Gillard JH, Samady H, Bennett MR. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13:210-20. Review.
- <sup>187</sup> Ando J, Yamamoto K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2013;99:260-268.
- <sup>188</sup> Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguez I, Del Carmen González M, Arribas S, Cerezo C, Segura J, Praga M, Fernández-Alfonso MS, Ruilope LM. Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens.* 2014;32:2082-2091.
- <sup>189</sup> Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009;73:411-8. Review.
- <sup>190</sup> Rabelink TJ, de Zeeuw D. The glycocalyx--linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11:667-76.
- <sup>191</sup> Vion AC, Ramkhalawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, Tedgui A, Lehoux S, Boulanger CM. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res.* 2013;112:1323-1333.
- <sup>192</sup> Huang PH, Huang SS, Chen YH, Lin CP, Chiang KH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Chen JW, Lin SJ. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J Hypertens.* 2010;28:1655-1665.
- <sup>193</sup> Wang L, Hauser ER, Shah SH, Pericak-Vance MA, Haynes C, Crosslin D, Harris M, Nelson S, Hale AB, Granger CB, Haines JL, Jones CJ, Crossman D, et al. Peakwide mapping on chromosome 3q13 identifies the kalirin gene as a novel candidate gene for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 2007;80:650-663.

- 
- <sup>194</sup> Krug T1, Manso H, Gouveia L, Sobral J, Xavier JM, Albergaria I, Gaspar G, Correia M, Viana-Baptista M, Simies RM, Pinto AN, Taipa R, Ferreira C et al. Kalirin: a novel genetic risk factor for ischemic stroke. *Hum Genet.* 2010;127:513-523.
- <sup>195</sup> Kone BC, Kunciewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285:F178-190.
- <sup>196</sup> Wang L, Hauser ER, Shah SH, Pericak-Vance MA, Haynes C, Crosslin D, Harris M, Nelson S, Hale AB, Granger CB, Haines JL, Jones CJ, Crossman D, et al. Peakwide mapping on chromosome 3q13 identifies the kalirin gene as a novel candidate gene for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 2007;80:650-663.
- <sup>197</sup> Payne S, Burney MJ, McCue K, Popal N, Davidson SM, Anderson RH, Scambler PJ. Acritical role for the chromatin remodeller CHD7 in anterior mesoderm during cardiovascular development. *Dev Biol.* 2015;405:82-95.
- <sup>198</sup> Randall V, McCue K, Roberts C, Kyriakopoulou V, Beddow S, Barrett AN, Vitelli F, Prescott K, Shaw-Smith C, Devriendt K, Bosman E, Steffes G, Steel KP, et al. Great vessel development requires biallelic expression of Chd7 and Tbx1 in pharyngeal ectoderm in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:3301-3310.
- <sup>199</sup> Bosman EA, Penn AC, Ambrose JC, Kettleborough R, Stemple DL, Steel KP. Multiple mutations in mouse Chd7 provide models for CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3463-3476.
- <sup>200</sup> Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, Herrero E, Balcells S, González-Duarte R. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol.* 2002;3:RESEARCH0027.
- <sup>201</sup> Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, Aebersold R, Simons K, Shevchenko A, Ejsing CS, Weissman JS. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature.* 2010;463:1048-1053.